

Diversitet av nano- og pikoplanteplankton i den atlantiske delen av Sørishavet, undersøkt med molekylærbiologiske metoder og bruk av numeriske likhets- og artsrikhetsanalyser.



Lars Nersveen  
Universitet i Oslo  
Biologisk Institutt  
Program for marinbiologi

27. januar 2011





Takk til Bente for grundig veiledning og oppfølging,  
Tom som kan alt og alltid hjelper,  
Wenche som alltid stiller opp,  
Sissel som har lært meg alt om å jobbe på lab,  
Pappa og Anna for korrekturlesing, og  
Mamma, Espen, Marit, Martin, Iben og Masja,  
siden jeg ikke kan takke Pappa og Anna uten å takke dem.

F/F Lance, det internasjonale polaråret og Bente  
skal også ha takk for at jeg fikk muligheten til å  
besøke Svalbard. Et eventyr jeg sent vil glemme.

Jeg vil også takke mine strålende medstudenter som  
har gjort min tid i Kristine Bonnevie's hus uforglemmelig.



## Sammendrag

Svepeflagellater (Haptophyta) er en utbredt planteplanktongruppe som finnes i alle verdens hav. De fleste representantene for denne algegruppen er små (vanligvis 2–20  $\mu\text{m}$ ), encellede, fotosyntetiserende flagellater. Det har lenge vært klart at det finnes mange ubeskrevne eller ukjente arter i denne gruppen. Dette har blitt bekreftet av molekylærbiologiske metoder i de siste 10 år. Det samme er tilfelle for protister generelt.

Hovedformålet med denne undersøkelsen var å se etter ukjent diversitet i Sørishavet blandt piko- og nanoplankton ( $< 35 \mu\text{m}$ ), med spesiell fokus på svepeflagellater. Dette ble gjort ved å studere klonbibliotek av ribosomalt DNA (rDNA) fra den lille (SSU) og den store (LSU) ribosomale subenheten, med prøver fra den atlantiske delen av Sørishavet. Prøvene ble samlet inn av forskningsfartøyet G.O. Sars i februar og mars 2008. I SSU rDNA-tilfellet ble generelle eukaryot-primere benyttet, slik at sentrale protistgrupper kunne oppdages, mens i LSU rDNA-tilfellet ble spesifikke primere rettet mot svepeflagellater benyttet.

Et annet formål med denne undersøkelsen var å se om informasjon fra klonbibliotek kan benyttes til å studere diversitet med numeriske metoder. Få studier basert på molekylærbiologiske metoder har undersøkt dette grundig. To hovedelementer av diversitet ble undersøkt; artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet) og likhet i artssammensetning mellom lokaliteter ( $\beta$ -diversitet).

De resulterende klonbibliotekene inneholdt totalt 432 sekvenser (122 OTU'er), hvorav mange var ubeskrevne eller ukjente, både innenfor Haptophyta (svepeflagellater), Dinophyta (dinoflagellater) og Ochrophyta (spesielt kiselalger). De ubeskrevne eller ukjente artene blandt svepeflagellatene plasseres i de samme taxaene hvor det tidligere er funnet ubeskrevne eller ukjente arter. Dette er sannsynligvis taksonomiske grupper som finnes mange steder, men som man ikke vet nok om. Den mest tallrike gruppen blandt LSU rDNA-sekvensene tilfalt en ukjent søstergruppe til *Phaeocystis* spp., en slekt man vet spiller en viktig økologisk rolle, det kan hende at denne ukjente gruppen også spiller en betydningsfull rolle. Dette betyr at det vil være av interesse å foreta grundigere undersøkelser av svepeflagellater i Sørishavet, helst supplert med morfologiske metoder og kulturer. Dette gjelder også for protister generelt, hvor det også var mange ubeskrevne eller ukjente sekvenser, spesielt blandt dinoflagellater.

Fra diversitetsundersøkelsene ser det ut til at det ikke finnes noen tilfredsstillende metode for ekstrapolering av artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet). Dette skyldes spesielt at klonbibliotek ikke gir noe bilde av den relative mengden individer fra hver art, men også fordi estimering av artsrikhet er problematisk generelt. Ved å begrense seg til tilstede-/ikke-tilstede-metoder virker det som om undersøkelser av likhet mellom lokaliteter kan gi mening ( $\beta$ -diversitet). Disse metodene understreket et godt kjent skille mellom artssammensetningen nord og sør for den antarktiske polarfronten i denne undersøkelsen, og har et mulig potensiale til å avdekke gradienter i artssammensetning av marine protister. Dette kan være spesielt interessant om man kan overvåke endringer av slike gradientene over tid.



# Innhold

<b>1. Innledning</b>	<b>5</b>
1.1 Sørishavet . . . . .	5
1.2 Planteplankton i Sørishavet . . . . .	5
1.3 Planteplanktongrupper i Sørishavet . . . . .	7
1.3.1 Svepeflagellater (Haptophyta) . . . . .	7
1.3.2 Andre protister . . . . .	8
1.4 Sørishavet og global oppvarming . . . . .	9
1.5 Molekylærbiologiske metoder ved diversitetsstudier . . . . .	9
1.6 Antagelser om diversitet basert på DNA-analyser . . . . .	10
1.7 Målsetning og problemstillinger . . . . .	12
<b>2. Materialer og metoder</b>	<b>15</b>
2.1 Innsamling av biologisk materiale . . . . .	15
2.1.1 Områdebeskrivelse . . . . .	15
2.1.2 Valg av stasjoner . . . . .	15
2.1.3 Prøveinnsamling . . . . .	15
2.2 Behandling av biologisk materiale . . . . .	17
2.2.1 DNA-isolering . . . . .	17
2.2.2 Polymerase kjedereaksjon (PCR) . . . . .	17
2.2.3 Agarosegelelektroforese . . . . .	17
2.2.4 Rensing av PCR-produkter før kloning . . . . .	19
2.2.5 Kloning . . . . .	19
2.2.6 Sekvensering av klonebibliotek . . . . .	20
2.3 Behandling av sekvenser . . . . .	20
2.4 Navngiving av svepeflagellatgrupper . . . . .	20
2.5 Definerings av OTU (“Operational Taxonomic Unit”) . . . . .	22
2.6 Numeriske analyser og datavisualisering . . . . .	22
2.6.1 Artsrikhet og likhet mellom lokaliteter . . . . .	22
2.6.2 Kart og datavisualisering . . . . .	22
<b>3. Resultater</b>	<b>23</b>
3.1 Hydrografiske forhold . . . . .	23
3.1.1 Fysiske parametre . . . . .	23
3.1.2 Kjemiske parametre . . . . .	23
3.2 Bestemmelse av OTU-nivå . . . . .	24
3.3 Taksonomisk fordeling basert på SSU rDNA-sekvenser . . . . .	24
3.4 Taksonomisk fordeling basert på LSU rDNA-sekvenser . . . . .	37
3.5 Diversitet og OTU-fordeling . . . . .	37

3.5.1	Artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet)	37
3.5.2	Geografisk avstand og taksonomisk avstand	44
3.5.3	Likhet ( $\beta$ -diversitet)	44
<b>4.</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>49</b>
4.1	Hydrografiske forhold	49
4.1.1	Fysiske parametre	49
4.1.2	Kjemiske parametre	49
4.2	Taksonomisk fordeling	50
4.2.1	SSU ribosomalt DNA	50
4.2.2	LSU ribosomalt DNA	51
4.3	Diversitet	52
4.4	Sammenheng mellom miljøvariable, klorofyll og artssammensetning	54
4.5	OTU-nivåer	54
4.6	Oppsummering og konklusjoner	55
	<b>Appendix</b>	<b>57</b>
<b>A</b>	<b>OTU-detalljer</b>	<b>57</b>
A.1	Gruppering av SSU rDNA-OTU'er ved 99% likhet	57
A.1.1	MESA	57
A.1.2	CLOTU	59
A.2	Stasjonsfordeling av OTU'er	60
A.2.1	SSU rDNA	60
A.2.2	LSU rDNA	62
<b>B</b>	<b>Protokoller</b>	<b>64</b>
B.1	CTAB miniprep DNA-ekstraksjon	64

# 1. Innledning

## 1.1 Sørishavet

Den antarktiske sirkumpolare strømmen (ACC) går rundt det Antarktiske kontinent med liten påvirkning fra kontinentene rundt (Orsi et al., 1995). ACC kan deles inn i soner basert på forskjeller i vannmassenes tetthet (Nowlin og Klinck, 1986), og den innerste av disse sonene avgrenses av den antarktiske polarfronten, APF (Moore et al., 1999). Sørishavet og dets omfang er ikke entydig bestemt, men Storbritannia definerer  $55^{\circ}\text{S}$ , noe sør for polarfronten, som den nordlige grensen i forskningsøyemed (International Hydrographic Organization, 1953). Kjennskap om området er stort sett begrenset til undersøkelser om sommeren, data fra forsyningskip til antarktiske landbaserte stasjoner (Treguer og Jacques, 1992) og data fra bøyer og andre automatiske sensorer (Gille, 2002). Man vet derfor lite om vintersesongen i forhold til sommersesongen.

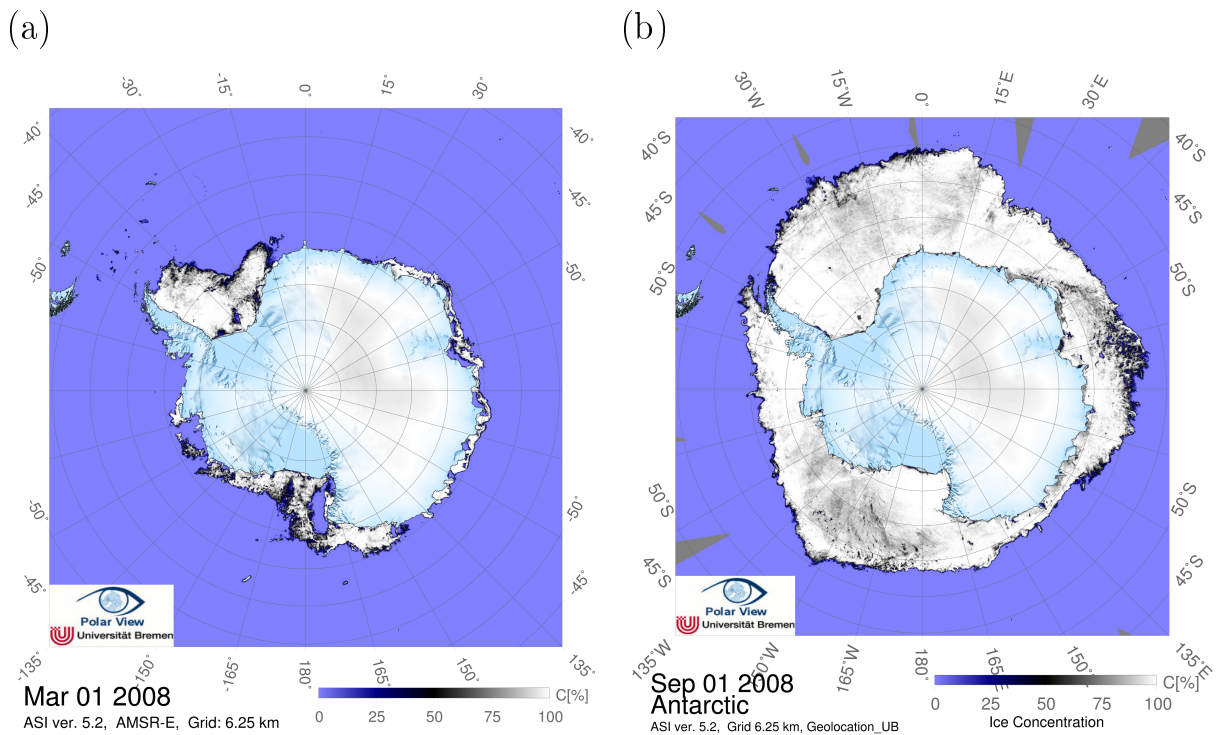
## 1.2 Planteplankton i Sørishavet

Når det gjelder undersøkelser av planteplankton i Sørishavet er det relevant å dele opp området fra polarfronten og sørover. Treguer og Jacques (1992) deler dette området inn i fem soner fra nord til sør; (i) Polarfrontsonen, (ii) Permanent åpent hav-sonen, (iii) Den sesongbaserte issonen, (iv) Kyst- og kontinentalsokkelsonen og (v) Den permanente issonen. Stasjonene i denne studien befinner seg i polarfrontsonen og permanent åpent hav-sonen. De beveger seg også inn i den sesongbaserte issonen, men siden det ikke var sjøis ved stasjonene i denne studien på innsamlingstidspunktet (se figur 1.1), og siden iskanten kun påvirker de nærmeste 250 km (Treguer og Jacques, 1992), regner jeg de potensielle sesongbaserte issone-stasjonene som permanent åpent hav-stasjoner.

Disse sonene har alle forskjellig økologi og produktivitet; planteplanktonoppblomstringer begrenser seg hovedsakelig til kyst- og kontinentalsokkelsonen, den sesongbaserte issonen og polarfrontsonen (Laubscher et al., 1993; Arrigo et al., 1998; Moore og Abbott, 2000). Bracher et al. (1999) fant en gradvis overgang fra dominans av mikrop plankton ( $20\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$ ) til dominans av nanoplankton ( $2\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$ ) fra polarfrontsonen, via permanent åpent hav-sonen til den sesongbaserte issonen (pikoplankton,  $< 2\text{ }\mu\text{m}$ , er ikke nevnt her). Også her var oppblomstringene begrenset til polarfrontsonen og den sesongbaserte issonen. Mesteparten av den årlige produksjonen (60 %) i den pelagiske delen av Sørishavet finner sted ved iskanten (Marchant og Thomsen, 1994).

Sørishavet opplever enorm sesongvariasjon med stor lysvariasjon og et sesongbasert isdekke (Tilzer, 1987; Marchant og Thomsen, 1994), og beskrives som et område med mye næringssalter, men lite klorofyll (HNLC, “high-nutrient-low-chlorophyll”), med klorofyllverdier  $< 0,3\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (Bracher et al., 1999), på tross av store mengder næringssalter (Treguer og Jacques, 1992;





Figur 1.1: Kart som viser a) isdekke den 1. mars (tidspunkt for prøvetaking) og b) den 1. september 2008 (maksimalt isdekke), laget med metoden beskrevet i Spreen et al. (2008). Kartene er hentet fra [http://www.iup.uni-bremen.de:8084/amsredata/asi\\_daygrid\\_swath/11a/s6250/2008/](http://www.iup.uni-bremen.de:8084/amsredata/asi_daygrid_swath/11a/s6250/2008/).

Bracher et al., 1999). Dette hadde man problemer med å forklare tidligere (Tilzer, 1987), og den vanligste forklaringen gikk ut på lysbegrenset algevekst grunnet dypt blandingslag (Marchant og Thomsen, 1994), men i dag forklares det av lave jernverdier (Martin et al., 1991; Boyd, 2002; Coale et al., 2004).

Man har funnet en sammenheng mellom fravær av klorofyll a og lave jernverdier gjentatte ganger (Martin et al., 1990; De Baar et al., 1995; Bracher et al., 1999; Moore og Abbott, 2000). Økte jernmengder ser ut til å fremme klorofyllsyntese (Rueter og Ades, 1987) i tillegg til å påvirke nitrat- og nitritt reduktase (Verstrete et al., 1980), men det er tilstede i så lave verdier i Sørishavet ( $< 10 \text{ nmol Fe kg}^{-1}$  [Martin et al., 1990]), at det har vært vanskelig å oppdage tidligere. Jern tilføres hovedsakelig fra land og ved oppvelling, noe som ikke forekommer i åpent hav (med unntak av frontområder), alternativet der er atmosfærisk støv, men dette området har de laveste verdiene for atmosfærisk støv i verden (Martin et al., 1990). Jern er kun begrensende for algevekst sør for polarfronten (men nord for det antarktiske kontinentet, hvor man også finner oppvelling), i polarfrontområdet begrenses vekst av makronærings saltene (nitrogen, fosfat og silikat, Dafner og Mordasova, 1994).

Sørishavet preges av generelt ustabile vannmasser hvor det øvre blandingslaget går dypere enn Sverdrups kritiske dyp (Bracher et al., 1999). Det er også et område preget av lav temperatur. Tilzer (1987) viser til at respirasjon reduseres mer enn fotosyntese ved en reduksjon i temperatur. Dette kan være en av forklaringene til at et inokulum med algeceller kan overleve lange mørketider. Lav temperatur virker også begrensende for maksimal vekstrate (Jacques, 1983; Bracher et al., 1999), i tillegg til å ha en påvirkning på maksimal fotosyntese (Tilzer et al., 1986).

Disse faktorene (dype blandingslag, jernbegrensning, mørketid (forsterket av isdekke) og lave

temperaturer) kan sannsynligvis forklare at produksjonen her tilsvarer mindre enn 5 % av den globale karbonproduksjonen fra fotosyntese, selv om Sørishavet utgjør 10 % av verdenshavenes område (Treguer og Jacques, 1992).

## 1.3 Planteplanktongrupper i Sørishavet

Nano- og pikoplankton (hhv.  $< 20 \mu\text{m}$  og  $< 2\text{--}3 \mu\text{m}$ ) er ikke like lette å studere med klassiske metoder (f.eks. lysmikroskopi) som mikrop plankton ( $20\text{--}200 \mu\text{m}$ ), i tillegg er de mindre gruppene vanskelige å oppkonsentrere med planktonhåver og preservere for videre undersøkelser. Mye av innsatsen har derfor tidligere fokusert på store og robuste diatomeer (Marchant og Thomsen, 1994). Mer moderne metoder som transmisjons-elektronmikroskopi (TEM) har tillatt innsyn i de mindre gruppene, men det har da vært fokus på morfologiske karakterer. I dag tillater molekylærbiologiske metoder undersøkelser av alle planktonstørrelser, og de samme metodene lar oss skille mellom arter som har identiske morfologiske karakterer. Etter at molekylærbiologiske metoder er blitt tatt i bruk har det blitt oppdaget stor genetisk planktondiversitet (Moon-van Der Staay et al., 2001; Liu et al., 2009).

Detmer og Bathmann (1997) fant dominans (opp til 90 %) av piko- og nanoplankton ved lave verdier av klorofyll a ( $0,2 - 0,4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), et bidrag som ble betydelig redusert ( $< 50$  %) i polarfrontområdet hvor planteplanktonbiomasse økte ( $> 1,8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Arrigo (1999) fant dominans av diatomeer i godt stratifiserte områder (5–20 m dype blandingslag), mens svepeflagellaten *Phaeocystis antarctica* dominerte der det var dypere blandingslag (25–50 m dype), grunnet *P. antarctica*'s evne til å utnytte svakt lys bedre enn diatomeer (Arrigo, 1999). Stoecker et al. (1995) viser til stor diversitet av heterotrofe nanoplankton under og etter en *Phaeocystis*-oppblomstring, blandt annet var ikke-tekate dinoflagellater tallrike blandt mikrozooplanktonet. Fotosyntetiske dinoflagellater og diatomeer var tilstede under selve *Phaeocystis*-oppblomstringen, men diatomeene var mye mer tallrike før og etter oppblomstringen, noe som indikerer en tidsforskyvning mellom *Phaeocystis*-dominans og dominans av diatomeer. Det var generelt lave mengder av fotosyntetiske dinoflagellater (i forhold til diatomeer og *Phaeocystis* spp.) gjennom hele perioden (november 1990 – januar 1991). Signorini et al. (2006) viste også til en lignende forskyvning i tid av oppblomstringer ved østkysten av Sør-Amerika, her mellom diatomeer og kokkolittoforider (svepeflagellater med kalkskjell, de Vargas et al., 2007), hvor diatomeene dominerer først etterfulgt av dominans av kokkolittoforider.

### 1.3.1 Svepeflagellater (Haptophyta)

Svepeflagellater er en algegruppe som for det meste består av marine, planktoniske, encellede former, med enkelte unntak (se Edvardsen og Medlin, 2007). De fleste har to flageller og et flagellignende festeorgan, haptonema (Jordan og Chamberlain, 1997). Svepeflagellater viser seg som en av de største bidragsyterne blandt planteplankton i gjentatte undersøkelser. Cuvelier et al. (2010) estimerer et bidrag på 25 % av svepeflagellater blandt pikoplanteplankton på verdensbasis, Jardillier et al. (2010) fant at svepeflagellater var største bidragsyter blandt små eukaryoter ( $< 5 \mu\text{m}$ ) målt i produksjon i en undersøkelse i det nordøstlige Atlanterhavet, og McDonald et al. (2007) beskriver svepeflagellatene som største bidragsyter i deres klonbibliotek i en DNA-undersøkelse av ultraplanteplankton ( $< 5 \mu\text{m}$ ). Liu et al. (2009) plasserer svepeflagellatene som den mest dominerende pikoplanktongruppen i de åpne hav (30–50 % av total fotosyntese i verdenshavene) basert på pigmentanalyser av satellittdata, en posisjon tidligere foreslått for cyanobakterier (Goericke og Welschmeyer, 1993). Pigmentet som her ble undersøkt (19'-hexanoyloxyfucoxanthin) finnes også i dinoflagellater med plastider som har opprinnelse

fra en svepeflagellat (f.eks. *Karenia brevis*), som resultat av tertiær endosymbiose (Yoon et al., 2005). Dette kan bety at estimatet til Liu et al. (2009) ikke er helt korrekt, men det antyder likevel stor innflytelse av svepeflagellater i verdenshavene. I Ryder Bay, Antarktis, fant Annett et al. (2009) en tallmessig dominans av svepeflagellatslekten *Phaeocystis*, men diatomeene stod her for størst biomasse.

Basert på tidligere svepeflagellatfunn kan Sørishavet deles inn i to tydelige soner: (i) polarfrontområdet, hvor kokkolittoforider (kalkflagellater) blir rapportert som viktigste svepeflagellatbidrag (Nishida, 1986; Bracher et al., 1999), og (ii), området sør for polarfronten, hvor kokkolittoforidene beskrives som tilnærmet fraværende (Nishida, 1986; Wright et al., 1996), med *Phaeocystis* spp. som viktigste slekt (Gieskes og Elbrächter, 1986). Sikes og Volkman (1993) fant en positiv lineær sammenheng mellom *Emiliania huxleyi* og temperatur, altså en reduksjon av *Emiliania huxleyi* med økende breddegrad. I en undersøkelse sør for polarfronten fant Gieskes og Elbrächter (1986) dominans av svepeflagellater i permanent åpent hav-sonen, mens det var dominans av diatomeer nærmere det Antarktiske kontinent. Kokkolittoforider er også observert i det samme området (Thomsen et al., 1988), noe som tyder på tilstedeværelse av kokkolittoforider både ved polarfronten og ved det antarktiske kontinent, men et fravær i permanent åpent hav-sonen. I tillegg til *Phaeocystis* spp. er *Chrysochromulina* spp. også observert i Sørishavet (Garrison og Buck, 1989; Jacques og Panouse, 1991), men det er ikke blitt gjennomført noen grundige undersøkelser som avslører mer om denne slektens relative bidrag. Marchant og Thomsen (1994) nevner at det må være minst 10 ubeskrevne former av *Chrysochromulina* i Antarktis, og Scott et al. (2005) beskriver 13 ukjente *Chrysochromulina*-typer (potensielle arter) basert på morfologi. I tillegg er det funnet sekvenser fra mange ubeskrevne svepeflagellatarter andre steder enn i Sørishavet (Moon-van Der Staay et al., 2001; McDonald et al., 2007; Liu et al., 2009; Cuvelier et al., 2010; Jardillier et al., 2010).

Fagotrofi er observert hos fotosyntetiske svepeflagellater som *Prymnesium patelliferum* (Tillmann, 1998), *Chrysochromulina* spp. (Jones et al., 1993; Marchant og Thomsen, 1994) og kokkolittoforider (Marchant og Thomsen, 1994). Det er også vist at oppløst organisk karbon (DOC) kan taes opp (Porter, 1988), en karbonform som skilles ut av alle alger og især *Phaeocystis* spp. (Davidson og Marchant 1992). Alle disse observasjonene tyder på at miksotrofi kan være svært utbredt blandt svepeflagellater, en egenskap som kan gi et konkurransefortrinn i områder med lite lys og dårlig tilgang på næringssalter.

*Phaeocystis* spp., som er tallrik i Sørishavet, er sammen med andre svepeflagellater (spesielt kokkolittoforider [Matrai og Keller, 1993]) kjent for å være en kilde til stoffet dimetylsulfid (DMS) (Andreae og Raemdonck, 1983), via et forløperstoff (dimetylsulfoniopropionat (DMSP) [Malin et al., 1992]). DMSP spiller en osmotisk rolle i algecellene, men reguleres ikke hurtig nok til kun å spille en rolle i osmoregulering (Stefels, 2000), DMSP foreslås derfor også som et forsvarsmiddel (Barnard et al., 1984; Wolfe et al., 1997). I tillegg har DMS en mulig påvirkning på jordens klimasystem ved å danne en aerosol som øker et områdes albedo (Malin et al., 1992), noe som betyr at svepeflagellater generelt, og *Phaeocystis* spp. spesielt, kan spille en rolle i forbindelse med global oppvarming (økt albedo reduserer oppvarming). Det er også vist at *Phaeocystis antarctica* har høyere kapasitet til å binde CO<sub>2</sub>, som deretter synker ut, enn diatomeer (Arrigo, 1999), noe som styrker den økologiske betydningen av denne arten.

### 1.3.2 Andre protister

Diatomeer (Ochrophyta, Bacillariophyceae) dominerer store deler av Sørishavet (Nishida, 1986; Garrison og Buck, 1989; Laubscher et al., 1993; Gomi et al., 2007). I polarfrontsonen er silikatverdiene lave (Treguer og Jacques, 1992) grunnet dominans av diatomeer, og silikat blir

derfor en begrensende faktor for diatomeer (Jacques, 1983). I store oppblomstringer dominerer gjerne diatomeer (Laubscher et al., 1993; Bathmann et al., 1997), og da også gjerne enkeltarter som *Fragilariopsis kerguelensis*, *Corethron* spp. (Bathmann et al., 1997), *Chaetoceros* spp., *Fragilariopsis* spp. (Laubscher et al., 1993), *Pseudo-nitzschia* spp. og *Thalassiothrix antarctica* (Smetacek et al., 2002). Clarke et al. (2008) viser også til dominans av store diatomeer om sommeren, men om vinteren er det nanoplanktonet som dominerer, dette er i tråd med at diatomeer trives i sjiktede vannmasser (se seksjon 1.3). Sør for polarfronten er det høye verdier av silikat (Treguer og Jacques, 1992).

Det er også observert dinoflagellater, spesielt med bidrag ved iskanten (Garrison og Buck, 1989; Gast et al., 2006; Gomi et al., 2007), og i kystnære (kyst- og kontinentalsokkelsonen) områder hvor de ser ut til å utgjøre en mindre andel enn diatomeene, men med *Dinophysis antarctica* som dominant blandt dinoflagellatene (Dodge og Priddle, 1987). Esper (2002) fant en fordeling av dinoflagellatcyster i sedimentene som følger en geografisk gradient, med den heterotrofe slekten *Protoperidinium* spp. i området rundt polarfronten (APF) og *Selenopemphix antarctica* lenger sør. Det ser ut til at dinoflagellater bidrar lite til produksjonen sør for polarfronten basert på pigmentanalyser (Wright et al., 1996), men pigmentanalyser tar ikke hensyn til heterotrofe former, som vi vet er tilstede lenger sør (ved iskanten og kystnære områder).

I tillegg er også kiselflagellater (Ochrophyta, Dictyochophyceae), gullalger (Ochrophyta, Chrysophyceae), olivengrønnalger (Chlorophyta, Prasinophyceae), grønnalger (Chlorophyta, Chlorophyceae), svelgflagellater (Cryptophyta, Cryptophyceae), øyealger (Euglenophyta, Euglenophyceae), krageflagellater (Choanoflagellida) og ciliater (Ciliophora) kjent fra Sørishavet (Scott et al., 2005).

## 1.4 Sørishavet og global oppvarming

Det viser seg at store deler av temperaturendringen som finner sted i verdenshavene finner sted i de øverste 300 metrene (Levitus, 2005). Den faktiske endringen ser ikke ut til å være størst i Sørishavet, men det var likevel en estimert økning på 0,17 °C i perioden 1950–1980 (Gille, 2002). Levitus (2005) estimerte også at verdenshavene er ansvarlig for 84 % av temperaturøkningen i perioden 1955–1998. Blandt de mest åpenbare problemene ved økt havtemperatur er (i vilkårlig rekkefølge): økt respirasjon for planteplanktonet (Tilzer, 1987), reduksjon av isdekket (Gille, 2002), noe som spesielt reduserer tilgjengelig areal for iskantoppblomstringer, og reduksjon av *Phaeocystis antarctica* med en tilhørende reduksjon av CO<sub>2</sub>-binding og -utsynking (se seksjon 1.3 og 1.3.1).

## 1.5 Molekylærbiologiske metoder ved diversitetsstudier

Enkelte deler av et genom er bemerkelsesverdig likt over store fylogenetiske avstander. Dette er fordi noen bestanddeler er absolutt nødvendige for overlevelse, et eksempel er ribosomene hvor proteinsyntesen foregår (Hillis og Dixon, 1991). Alle organismer har ribosomer, og disse har samme funksjon i alle organismer. Det er derfor et lignende seleksjonstrykk på ribosomer uavhengig av hvilket takson man ser på, i tillegg er ribosomalt DNA sammenlignbart (man kan lage en sekvenssammenstilling og undersøke forskjeller mellom sekvenser).

I tillegg til konserverte (få forandringer) områder har man også variable regioner i DNA'et som koder for ribosomalt RNA, rDNA (Hillis og Dixon, 1991). For å oppformere rDNA for videre undersøkelser trenger man en primer (et kort DNA-fragment) som er komplementær til et ønsket målområde i rDNA'et til målorganismene. Dette området ligger gjerne i en konservert region

med en etterfølgende variabel region. Den konserverte regionen benyttes til å plassere sekvenser i forhold til hverandre i en sekvenssammenstilling, mens den variable regionen benyttes til å undersøke forskjeller mellom sekvensene.

DNA-operonet som inneholder rDNA er delt opp i DNA som blandt annet koder for SSU rDNA (den lille subenheten) og LSU rDNA (den store subenheten). Av disse er det den lille subenheten (SSU) som har blitt undersøkt mest, dette fordi det er det tregest evolverende rDNA-fragmentet (Hillis og Dixon, 1991). SSU rDNA har derfor ofte blitt brukt til å avdekke slektskapsrelasjoner på høyt taksonomisk nivå (f.eks. klasser). Den store subenheten (LSU rDNA) har noen områder med raskere evolusjon enn SSU rDNA (Hillis og Dixon, 1991), og kan derfor noen ganger avdekke slektskap mellom nærmere beslektede organismer enn hva SSU rDNA er i stand til. I tillegg til disse to regionene finnes det mer variable ikke-kodende områder (f.eks. ITS-1 og ITS-2 som også befinner seg i rDNA-operonet) som benyttes til å skille mellom nært beslektede organismer (Vaulot et al., 2008).

Generelle primere er utviklet for konserverte områder i store organismegrupper (f.eks. for alle eukaryote organismer, som brukt i Medlin et al. (1988) for SSU rDNA). Spesifikke primere oppformerer en spesifikk organismegruppe (f.eks. svepeflagellatspesifikke primere, som brukt i Liu et al. (2009) for LSU rDNA). Disse primerne er nødvendige for å oppformere DNA vha en polymerase kjedereaksjon (PCR) til konsentrasjoner som er store nok til at DNA'et kan analyseres videre. Dersom man har en monokultur (en kultur bestående utelukkende av én art) kan man sekvensere produktet fra en polymerase kjedereaksjon direkte, men om man har en miljøprøve (f.eks. en vannprøve fra havet), må man først skille DNA-fragmenter fra ulike organismer (i praksis individer) fra hverandre før man kan sekvensere PCR-produktet.

Det siste problemet kan løses ved å lage et klonbibliotek av et PCR-produkt som stammer fra en vannprøve. I en kloningsreaksjon blandes et PCR-produkt med plasmider (ringformede DNA-molekyler) før plasmidene blandes med bakterier (kompetente celler av *E. coli*) som er i stand til å ta opp eksternt DNA (i dette tilfellet plasmider). Et plasmid vil kun ta opp ett DNA-fragment fra PCR-produktet, og en bakteriecelle vil kun ta opp ett plasmid. Bakteriene som har plukket opp et plasmid med et DNA-fragment dyrkes frem på en agarskål, deretter plukkes enkeltkolonier (som hver representerer ett plasmid med ett DNA-fragment) fra agarplatene. DNA-et i disse enkeltkoloniene (nærmere bestemt DNA-et i plasmidene) oppformerer deretter via en ny polymerase kjedereaksjon, og denne gangen inneholder PCR-produktet DNA fra kun én organisme. Dette produktet kan deretter sekvenseres og identiteten til organismene i den opprinnelige vannprøven kan avdekkes. Siden dette er krevende arbeid er klonbibliotekenes størrelse begrenset (vanligvis i området 50 – 200 sekvenser per prøve).

Dersom man ønsker mer enn noen hundre sekvenser kan man ty til raskere metoder enn kloning. Metoder som 454-sekvensering (Rothberg og Leamon, 2008) tillater sekvensering av tusenvis av DNA-fragmenter (Mardis, 2008), men foreløpig gir metoden redusert kvalitet og lengde på sekvensene (omtrent 400 basepar idag). Dette er en metode i sterk utvikling (Rothberg og Leamon, 2008), som går mot lengre sekvenser og lavere kostnader.

## 1.6 Antagelser om diversitet basert på DNA-analyser

Diversitet slik jeg har undersøkt det kan deles opp i to elementer (Whittaker, 1960); rikhet (antall arter,  $\alpha$ -diversitet) og likhet (forskjell i artssammensetning mellom lokaliteter,  $\beta$ -diversitet). I tillegg kan man undersøke total rikhet i et større område ( $\gamma$ -diversitet), men det er det ikke grunnlag for i denne undersøkelsen. Rikhet fokuserer på antall arter ved en lokalitet, som i mitt tilfelle er en stasjon, mens likhet fokuserer på endringer og mulige gradienter i artssammensetning mellom undersøkelsens fire stasjoner.

Antall kopier av SSU rDNA-genet varierer enormt blandt eukaryoter (fra 1 kopi hos *Nannochloropsis salina*, til mer enn 12.000 kopier hos dinoflagellater som *Akashiwo sanguinea* (Zhu et al., 2005). Dette gjør det vanskelig å estimere rikhet basert på antall sekvenser (eller kopier av sekvenser). Amaral-Zettler et al. (2009) har forholdt seg til dette problemet ved å bruke tilstede/ikke-tilstede-metoder, altså metoder som kun forholder seg til enten tilstedeværelsen av en art eller fraværet av arten.

I tillegg til problemet med kopinumner dukker det også opp problemer i forbindelse med PCR. Det er først og fremst to typer problemer (Acinas et al., 2005): (i) PCR-feil (direkte feil under DNA-syntesetrinnet), og (ii) PCR-skjevheter (favorisering av enkelte sekvenser, typisk ved mange PCR-sykluser [ $> 30$ , Reysenbach et al., 1992; Suzuki og Giovannoni, 1996], eller ved forskjell i GC-mengde i templat-DNA [Suzuki og Giovannoni, 1996]). Begge disse feilkildene vil kunne føre til feil ved diversitetsanalyser. Det kan hende at effekten av PCR-skjevheter blir redusert ved tilstede/ikke-tilstede-metoder, men det forutsetter at de fleste artene i prøven blir oppdaget (det har ikke noe å si hvor mange “kopier” man finner av hvert individ ved tilstede/ikke-tilstede-metoder). Det finnes indikasjoner på at dette faktisk er tilfelle, Suzuki og Giovannoni (1996) fikk et 1:1-forhold av sine to templat-er uavhengig av det opprinnelige templatforholdet. I tillegg til feil ved PCR kan forskyvninger/favoriseringer oppstå allerede ved prøveinnsamling (Reysenbach et al., 1992), et problem som kan reduseres ved å øke prøvevolum og antall replikater.

Det er ingen lang historie for diversitetsanalyser basert på DNA-sekvenser fra eukaryoter (Amaral-Zettler et al., 2009), men det har blitt gjort noen (bl.a. Sogin et al., 2006; Quince et al., 2008; Liu et al., 2009), og selv om det er en del problemer knyttet til disse metodene, vil enkelte kunne sammenligne ulike samfunn (Hughes et al., 2001).

Ekstrapolering ved å tilpasse en modell til en arts-akkumulator-kurve, en kurve som viser antall oppdagede arter som funksjon av antall prøver (Palmer, 1990; Colwell og Coddington, 1994) kan være problematisk. Dersom man har for små prøvestørrelser, vil mange forskjellige kurver kunne passe til akkumuleringskurven, men gi meget forskjellige asymptoter (og dermed rikhetsestimater) (Hughes et al., 2001), i tillegg til at to like undersøkelser med liten prøvestørrelse sannsynligvis ikke vil produsere like arts-akkumulator-kurver. Dette er derfor ikke egnet for vanlige klonbibliotek med relativt få prøver.

Parametriske metoder (metoder som antar at dataene som skal undersøkes kommer fra en statistisk fordeling) krever (i) kjennskap til relativ abundans og (ii) store datasett (Hughes et al., 2001). Med tilstede/ikke-tilstede metoder forsvinner informasjonen om relativ abundans, og nok en gang vil klonbibliotek gi problemer med størrelsen på datasettet. Ikke-parametriske estimerer er ikke like kravstore, siden de ikke antar en underliggende fordeling for dataene som skal undersøkes, og anbefales for mikrobielle data av Hughes et al. (2001). Disse metodene kan også være problematiske med tanke på de eventuelle feilkildene som allerede er beskrevet (én sekvens tilsvarer ikke ett individ uansett hvilken metode som benyttes). Det finnes også antydninger til at rikhetsestimatorene som brukes i dag (f.eks. Chao1 og ACE [Sogin et al. 2006; Liu et al. 2009]) ikke presterer bra i store habitater (Ugland og Gray, 2004), det ser i det hele tatt ut til at estimatorer av denne sorten kun presterer godt når samplingen i et område har oppdaget alle artene som lever der (Ugland og Gray, 2004).

Interpolering, en metode som estimerer verdier innenfor området til allerede kjente verdier, for eksempel ved hjelp av rarefaction (Heck Jr et al., 1975), er mindre problematisk siden man her kun tar hensyn til den informasjonen som er tilgjengelig (rarefaction betyr “fortynning” på norsk, men jeg benytter det engelske ordet siden det refereres til en konkret metode). Man prøver altså ikke å si noe om det man ikke har informasjon om. Dersom man har funnet 20 arter ved å analysere 80 individer, vil rarefaction kunne estimere hvor mange arter man ville ha

funnet ved å analysere mindre enn 80 individer (f.eks. 50 individer). Dette er en metode med en begrenset variasjon (i dette tilfellet kan ikke estimatet bli mer enn 20 arter, ved ekstrapolering kan et estimat teoretisk sett bli alle tall som er større enn 20). Man må likevel være forsiktig med tolkning av rarefaction-kurver da de også kan preges av den nevnte problematikken med DNA-sekvenser.

En annen mulighet for å sammenligne lokaliteter er likhetsindekser. Dersom alle lokaliteter behandles på samme vis, altså at man benytter standardiserte metoder og lik arbeidsintensitet på hver prøve, kan man sammenligne dem. Det finnes mange likhetsindekser, også for tilstede/ikke-tilstede-data (Koleff et al., 2003), men de opererer stort sett likt. Ved å sammenligne antall unike og antall felles arter ved to lokaliteter vil indeksene gi et tall mellom 0 og 1, som enten angir likhet eller ulikhet mellom de to lokalitetene, avhengig av hvilken indeks som benyttes. Et eksempel på en slik indeks (og den som benyttes i denne studien), er simpsonindeksen (Simpson, 1949):

$$\beta = \frac{\min(b, c)}{\min(b, c) + a} \quad (1.1)$$

hvor  $\beta$  er et tall mellom 0 og 1. Her representerer  $b$  arter som kun forekommer i den ene av de to lokalitetene som skal sammenlignes,  $c$  representerer arter som kun forekommer i den andre lokaliteten og  $a$  representerer arter som forekommer i begge lokalitetene. Dersom alle artene i undersøkelsen befinner seg i begge lokalitetene vil  $b = c = 0$  og  $\beta = 0$ , og tilsvarende, dersom ingen arter deles av de to lokalitetene vil  $a = 0$  og  $\beta = 1$  (teller og nevner blir like). Det vil si at  $\beta$  uttrykker graden av ulikhet i artssammensetning mellom to lokaliteter. Jeg har benyttet  $1 - \beta$  for å i stedet uttrykke graden av *likhet* i artssammensetning. Legg også merke til at denne indeksen ikke forholder seg til antall individer tilstede av en art, kun om hvorvidt arten er tilstede eller ikke.

Disse verdiene kan igjen korreleres med geografisk avstand (Harrison et al., 1992; Clarke og Lidgard, 2000) eller en annen miljøvariabel, og man kan på den måten undersøke eventuelle sammenhenger mellom artssammensetning og miljøvariable.

## 1.7 Målsetning og problemstillinger

Det er funnet mange ubeskrevne eller ukjente sekvenser blandt svepeflagellater i flere av verdens hav. Denne gruppen har ikke tidligere blitt undersøkt i Sørishavet med spesifikke DNA-metoder (metoder rettet mot svepeflagellater). I denne studien er prøver fra fire stasjoner undersøkt med molekylærbiologiske metoder, både med metoder rettet spesifikt mot svepeflagellater og mot planktoniske protister generelt.

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke diversiteten av nano- og pikoplankton, spesielt av svepeflagellater, ved hjelp av molekylærbiologiske metoder i den atlantiske delen av Sørishavet.

Numeriske diversitetsanalyser blir i liten grad benyttet i molekylærbiologiske studier, men det kan finnes informasjon om artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet) og likhet mellom lokaliteter ( $\beta$ -diversitet) i et slikt datamateriale. I denne undersøkelsen er forskjellige numeriske metoder blitt benyttet på datasett fremkommet fra molekylærbiologiske metoder.

Oppgavens andre mål var å undersøke om numeriske diversitetsanalyser, med fokus på artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet) og likhet mellom lokaliteter ( $\beta$ -diversitet), kan benyttes på data fra molekylærbiologiske metoder. Følgende spørsmål ble stilt:

- Hvilke taksa av nano- og pikoplankton, spesielt av svepeflagellater, finner vi i det undersøkte området av den atlantiske delen av Sørishavet?

- Er artssammensetningen den samme ved undersøkelsens fire stasjoner?
- Er det hensiktsmessig/mulig å estimere artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet) basert på de oppdrevne klonbibliotek-sekvensene?
- Er det hensiktsmessig/mulig å undersøke gradienter i artssammensetning ( $\beta$ -diversitet) basert på de oppdrevne klonbibliotek-sekvensene?





## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Innsamling av biologisk materiale

#### 2.1.1 Områdebeskrivelse

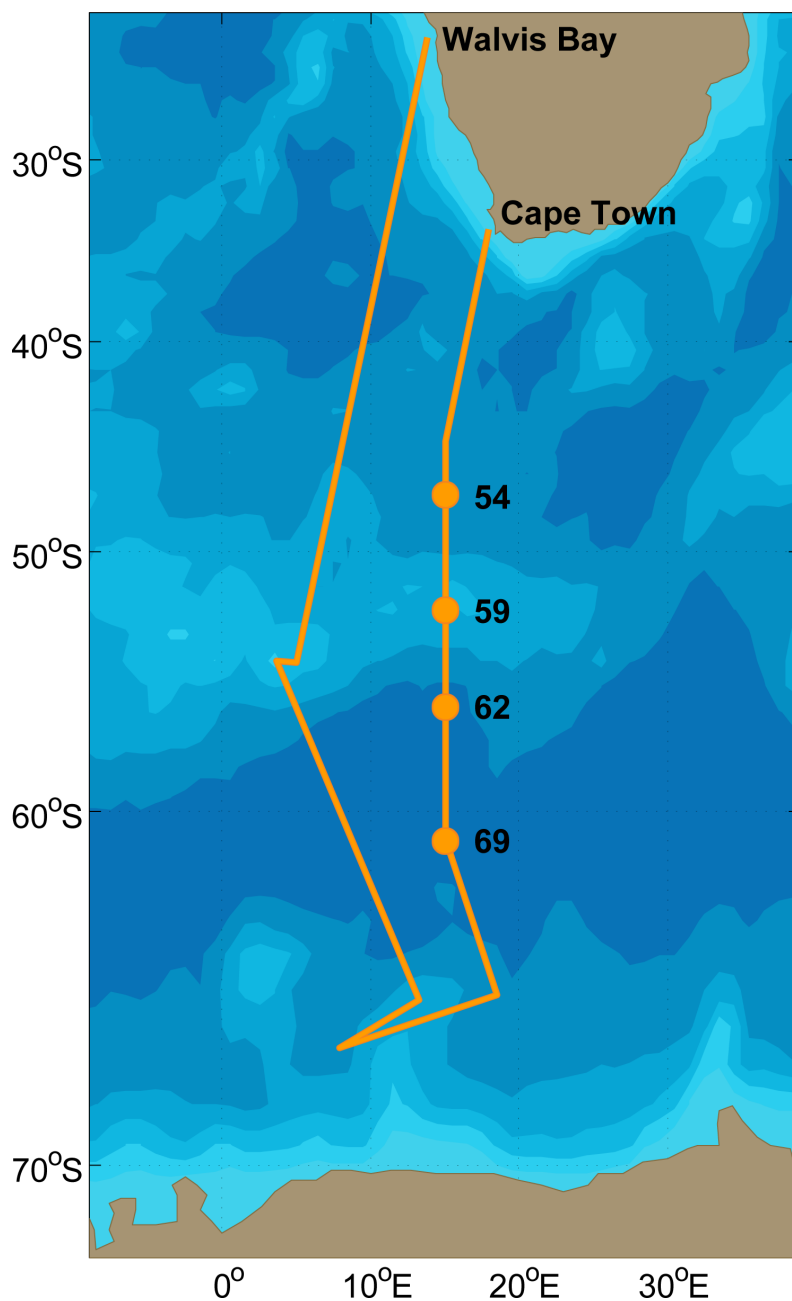
Prøver til denne forskningsoppgaven ble samlet inn i Sørishavet av Bente Edvardsen med forskningsfartøyet G.O. Sars under det internasjonale polaråret (IPY), som strakk seg over to australe somre fra 2007 til 2009. Skipet gikk fra Cape Town, Sør-Afrika, 19. februar 2008 og endte opp i Walvis Bay, Namibia, 28. mars 2008. De fire stasjonene som ble benyttet i denne oppgaven (se tabell 2.1) lå langs transektet som gikk fra  $15^{\circ}\text{Ø } 47,5^{\circ}\text{S}$  til  $15,1^{\circ}\text{Ø } 60,9^{\circ}\text{S}$  (se figur 2.1). Stasjonene fikk navn/nummer basert på CTD-målinger, stasjonene med to numre i navnet er tilknyttet to påfølgende CTD-kast som tar vannprøver fra forskjellige dyp, men på samme lokalitet, og behandles i denne oppgaven som én stasjon (med første nummer som navn).

#### 2.1.2 Valg av stasjoner

Forskningsfartøyet G.O. Sars besøkte flere stasjoner enn de fire jeg har valgt å undersøke. De fire stasjonene som er undersøkt i denne oppgaven er valgt basert på flere kriterier; de har forskjellige klorofyllnivåer og derfor potensielle forskjeller i artssammensetning, de ligger på en rett linje langs den samme lengdegraden, noe som gjør det lett å undersøke sammenheng mellom artssammensetning og geografisk avstand (breddegrad), de er plassert både nord for (54) og sør for polarfronten (59, 62 og 69), og representerer derfor også ulike vannmasser, og de spenner over et så langt område som mulig uten å bryte med den rette linjen.

#### 2.1.3 Prøveinnsamling

Ved hver CTD-stasjon (se tabell 2.1) ble ledningsevne (C, "Conductivity"), temperatur (T), trykk (dybde, D) og fluorescens målt vha et CTD-apparat (Model No ST 10500m, SBE Sea-Bird Electronics, Bellevue, Washington, USA). Vann fra hvert dyp ble hentet inn vha Niskin-flasker. Tjue mL ble fiksert med 200  $\mu\text{L}$  Kloroform (pro analysis, Merck, Darmstadt, Tyskland) og oppbevart ved  $4^{\circ}\text{C}$  for senere næringssaltanalyse, 250 mL ble filtrert gjennom glassfiltre (Munktell Filter MGF, 25 mm diameter, ca 0,45 mm maskevidde, Glycksbo, Sverige) og filter med algeceller ble oppbevart ved  $-20^{\circ}\text{C}$  for senere klorofyllanalyse, og 100 mL (på forhånd silt gjennom en 35  $\mu\text{m}$  sil) fra hvert prøvedyp (se tabell 2.1) ble blandet sammen, før 200 mL av blandingen ble filtrert (Whatman, 25 mm, 0,8  $\mu\text{m}$ ) for senere DNA-analyser og frosset ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Figur 2.1: Oversiktskart over området hvor prøvene ble samlet inn.

Tabell 2.1: Oversikt over stasjoner og prøver samlet inn for DNA-analyse.

Dyp (m) viser hvilke dyp som er inkludert i en endelig blandeprøve fra stasjonen.

Stasjon	Dato	Breddegrad	Lengdegrad	Dyp (m)	DNA-preparatnr
54	23.02.08	47,5 °S	15 °Ø	75,50,30,20,10,5	P206, P207
59	24.02.08	52,5 °S	15 °Ø	150,100,75,50,30,20,10,5	P214
62	26.02.08	56,2 °S	15 °Ø	150,100,75,50,30,20,10,5	P216
69	28.02.08	60,9 °S	15,1 °Ø	150,100,75,50,30,20,10,5	P222, P223

## 2.2 Behandling av biologisk materiale

### 2.2.1 DNA-isolering

Isolering av DNA fra polykarbonatfiltre med vannprøver ble utført ved hjelp av CTAB-metoden (av Sissel Brubak, se Appendix B for protokoll) Seks DNA-isolater fra de 4 stasjonene ble brukt i videre analyser (se tabell 2.1 for preparatnummer).

### 2.2.2 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Både DNA (rDNA) som koder for den lille (SSU) og for den store (LSU) ribosomale subenheten ble benyttet som målområde i PCR-reaksjonene. For generell undersøkelse av miljøprøvene ble generelle eukaryot-primere for SSU rDNA benyttet (1F og 1528R, se tabell 2.2), mens for oppformering av kun svepeflagellat-DNA ble svepeflagellatspesifikke primere for LSU rDNA benyttet (hapto4F og euk34R, se tabell 2.2).

#### Reaksjonsmiks

I alle PCR-reaksjoner (50  $\mu$ L) ble PCR-vann (20,8  $\mu$ L, 5PRIME, Hamburg, Tyskland), DNA-templat (5  $\mu$ L), 10X Buffer (5  $\mu$ L), dNTP (2 mM, 5  $\mu$ L), Taq Master Enhancer (10  $\mu$ L, forvarmet til 65 °C), 5PRIME Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ L, 0,2  $\mu$ L) og 2  $\mu$ L av 5  $\mu$ M primere benyttet. Ved PCR av plukkede kloner ble alle volum halvert (25  $\mu$ L per reaksjon). Som primere ble M13F (1  $\mu$ L, se tabell 2.2) og M13R (1  $\mu$ L, se tabell 2.2) sammen med annen buffer (Dynazyme 10X Buffer, 2,5  $\mu$ L) og polymerase (Dynazyme, 0,1  $\mu$ L) benyttet. PCR-rør/-plater ble deretter inkubert i en Thermo Mastercycler (Mastercycler<sup>®</sup> ep, Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland).

#### PCR-program

Programmet benyttet for PCR av SSU rDNA bestod av initiell denaturering ved 94 °C i 3 minutter, fulgt av 35 sykluser med denaturering ved 94 °C i 45 sekunder, hybridisering av primer ved 50 °C i 45 sekunder, og DNA-syntese ved 68 °C i 3 minutter. Avsluttende forlengelse ble gjort ved 68 °C i 10 minutter. Antallet sykluser her (35) ble kun benyttet i PCR-reaksjon L11, da antallet ble redusert til 30 i senere reaksjoner for å unngå/ redusere antallet kimærer (Acinas et al., 2005).

Programmet benyttet for PCR av LSU rDNA var det samme som for SSU rDNA, bortsett fra bruk av en annen hybridiseringstemperatur (54 °C) siden det her benyttes andre primere. Alle PCR-reaksjoner av LSU rDNA ble gjennomført med 30 sykluser.

Programmet benyttet for PCR av plukkede kloner bestod av initiell denaturering ved 94 °C i 10 minutter, fulgt av 25 sykluser med denaturering ved 94 °C i 1 minutt, hybridisering av primer ved 55 °C i 1 minutt, og DNA-syntese ved 72 °C i 1 minutt. Avsluttende forlengelse ble gjort ved 72 °C i 10 minutter.

### 2.2.3 Agarosegelelektroforese

For å undersøke om PCR-produktene inneholdt DNA-fragmenter av ønsket lengde, og for å få et inntrykk av mengden DNA i PCR-produktet, ble agarosegelelektroforese benyttet. Samtlige agarosegeler bestod av 0,08 % agarose (SeaKem<sup>®</sup> LE agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA), det totale volumet varierte avhengig av hvor mange prøver som skulle undersøkes. 5  $\mu$ L GelRed (GelRed<sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, CA, USA) pr 50 mL 1X

Tabell 2.2.: Oversikt over primere som ble brukt i oppgaven (F = Fremover, R = Revers, sekv. = sekvensering).

Primerkode	Bruksområde	Tråd	Sekvens (5'—3')	Posisjon	Kilde
1F	PCR av SSU rDNA	F	AACCTGGTTGA TCCTGCCAGT	1-21	Medlin et al. (1988)
1528R	PCR av SSU rDNA	R	TGATCCTTCTGC AGGTTCACTAC	1795-1772	Medlin et al. (1988)
Hapto4F	PCR og sekv. av LSU rDNA	F	ATGGCGAATGAA GCCGGGC	904-921	Lin et al. (2009)
Euk34R	PCR av LSU rDNA	R	GCATCGCCAGTT CTGCTTACC	1886-1906	Lin et al. (2009)
528F	Sekvensering av SSU rDNA	F	GCGGTAATTCCA GCTCCAA	575-590	Elwood et al. (1985)
M13F	PCR av vektor fra kloning	F	GTAAACGACGGCCAG CTGGCCGTCGTTTAC	355-370	TOPO TA cloning® (Invitrogen)
M13R	PCR av vektor fra kloning	R	CAGGAACACAGCT ATGAC	205-221	TOPO TA cloning® (Invitrogen)

TAE-buffer (fremstilt av Sissel Brubak etter protokoll i Sambrook og Russel, 2001) ble brukt for at DNA'et skulle synliggjøres ved UV-belysning. Blandingen av agarose, 1X TAE-buffer og GelRed ble helt over i et elektroforesekammer (Bio Rad, wide mini sub<sup>TM</sup> cell, Italia) med kammer (for å lage brønner). Én  $\mu\text{L}$  loading buffer (6x Loading Dye Solution, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Tyskland) ble blandet med 5  $\mu\text{L}$  PCR-produkt og applisert i hver sin brønn. To  $\mu\text{L}$  av markøren Lambda EcoR I/Hind III (ABgene House<sup>®</sup>, Surrey, England) ble brukt i første brønn for å etterse at DNA-fragmentene hadde den ønskede lengden. I alle tilfeller ble gelen kjørt i 40 minutter ved 80 V (Electrophoresis Power Supply - EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Deretter ble gelen observert og fotografert i UV-kabinett (Gene Genius, Bio Imaging System, SYNGENE, England).

#### 2.2.4 Rensing av PCR-produkter før kloning

Alle PCR-produkter ble rensset på gel for å fjerne mest mulig av primerdimere (korte DNA-fragmenter av hybridiserte primere) og andre uønskede komponenter i PCR-reaksjonen. En 100 mL agarosegel med 1 % agarosekonsentrasjon ble benyttet. 9  $\mu\text{L}$  loading buffer (6x Loading Dye Solution, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Tyskland) ble blandet med 45  $\mu\text{L}$  PCR-produkt og applisert i annenhver brønn. Her ble 3  $\mu\text{L}$  av markøren O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Tyskland) brukt. Gelen ble så kjørt i 1 time ved 80 V i samme maskin som beskrevet over. Etter kjøring ble gelen lagt på et UV-bord hvor området med det ønskede DNA'et ble skåret ut med skalpell og plassert i forhåndsveide eppendorfrør. Deretter ble protokollen til rensekit (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, USA) fulgt.

#### 2.2.5 Kloning

Agarskåler ble laget på forhånd ved å blande 15 g agar (Agar-agar, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), 25 g bakterienæring (Difco<sup>TM</sup> LB Broth, Becton, Dickinson and Company, MD, USA) og destillert vann til et totalvolum på 1 L. Flasken med mediet ble deretter autoklavert ved 121 °C i 15 minutter før 1 mL 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  antibiotika (Ampicillin-Na, VWR International A.S., Oslo, Norge) ble tilsatt (når mediet holdt 50 – 60 °C). Agarløsningen ble deretter fordelt på petriskåler (ca 20 skåler). I kloningsreaksjonen ble protokollen fra TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing (K4575-01, Invitrogen, CA, USA) fulgt, mine valg beskrives i de neste seksjonene.

#### Ligering

Én  $\mu\text{L}$  saltløsning og 1  $\mu\text{L}$  TOPO vektor (fra ovennevnte TOPO-kit) per klonereaksjon ble blandet i et rør. Deretter ble denne blandingen tilsatt 4  $\mu\text{L}$  rensset PCR-produkt for hver klonereaksjon, for så å inkuberes i omtrent 30 minutter i romtemperatur. Deretter ble ligeringsproduktene satt på is.

#### Transformasjon

TOP10 OneShot<sup>®</sup> kjemisk kompetente *E. coli*-celler (fra ovennevnte TOPO-kit) ble tint sakte på is før 2  $\mu\text{L}$  ligeringsprodukt ble tilsatt røret. Denne blandingen ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter og deretter utsatt for varmesjokk ved 42 °C i nøyaktig 30 sekunder, før rørene ble overført til is. 250  $\mu\text{L}$  romtemperert S.O.C.-medium (fra ovennevnte TOPO-kit) ble tilsatt før kloningsreaksjonen ble inkubert i risteinkubator (Certomat<sup>®</sup> IS Incubation-Shaker, Sartorius

Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Tyskland) i 1 time ved 37 °C og 200 rpm. Kloningsreaksjonens omtrent 250  $\mu$ L ble deretter strøket ut over agarskåler (forvarmet til 37 °C) med steril glasstav, 50  $\mu$ L per agarskål. Platene ble deretter inkubert i 37 °C over natten (omtrent 17–18 timer).

## Plukking av kloner

Reaksjonsmiks som beskrevet i seksjon 2.2.2 ble pipettert i en PCR 96 brønners mikropate, 25  $\mu$ L per brønn. Deretter ble sterile pipettespisser brukt til å plukke isolerte kloner fra agarskålene, én klon i hver brønn (se tabell 2.3 for oversikt over kloningsreaksjoner). Platen ble deretter plassert i en Thermo Mastercycler med PCR-program som beskrevet i seksjon 2.2.2.

### 2.2.6 Sekvensering av klonebibliotek

Etter visualisering på agarosegel av PCR-produkter fra kloning, ble utvalgte prøver sendt til sekvensering. En oversikt over prøver sendt til sekvensering, og hvilke sekvenser som er brukt i videre analyser kan sees i tabell 2.3. Før sekvensering ble klonene rensset med ExoSAP-IT<sup>®</sup> (Usb<sup>®</sup> Corporation, Cleveland, Ohio USA); ExoSap-IT<sup>®</sup> ble fortynnet med MilliQ-vann til en konsentrasjon på 10 % ExoSap-IT<sup>®</sup>. Forholdet ExoSap-IT<sup>®</sup>:PCR-produkt skal være omtrent 2:5, jeg benyttet 2, 57  $\mu$ L ExoSap-IT<sup>®</sup> og 6, 43  $\mu$ L PCR-produkt (totalvolum 9  $\mu$ L). Blandingen ble inkubert i en Thermo Mastercycler i 30 minutter ved 37 °C og 15 minutter ved 80 °C, deretter ble 2  $\mu$ L primer (528F for SSU rDNA, Hapto4F for LSU rDNA, se tabell 2.2) tilsatt, før prøvene ble sendt til sekvensering hos ABI-laben ved Universitetet i Oslo. Inkubering ved 37 °C ble gjort i 30 minutter i stedet for vanlige 15 minutter grunnet fortynning av ExoSAP-IT<sup>®</sup>.

## 2.3 Behandling av sekvenser

Først ble uklare områder i endene av sekvensene kuttet vekk i programmet BioEdit (Hall, 1999). Deretter ble den mest like sekvensen funnet ved hjelp av BLAST (Altschul et al., 1990) for alle SSU rDNA-sekvenser med unntak av svepeflagellatsekvensene. For svepeflagellatsekvenser fra SSU og LSU rDNA brukte jeg sekvensssammenstillinger av svepeflagellatsekvenser (sammenstilt av Bente Edvardsen). SSU rDNA-sekvensene sammen med BLAST-resultatene, og svepeflagellatsekvensene sammen med nevnte sekvensssammenstillinger ble deretter alignet ved hjelp av SILVA (Pruesse et al., 2007). Fylogenetiske trær basert på sekvensssammenstillingene fra SILVA ble laget ved hjelp av <http://www.phylogeny.fr/> (Dereeper et al., 2008) og etterbehandlet i TreeView (Page, 1996). Enkelte grupper i sekvensssammenstillingene for svepeflagellater, hvor ingen av mine sekvenser havnet, ble kollapset i Figtree (Morariu et al., 2008) for å spare plass. De fylogenetiske trærne ble redigert i Adobe Illustrator (<http://www.adobe.com/no/products/illustrator/>).

## 2.4 Navngiving av svepeflagellatgrupper

Alle svepeflagellater har blitt plassert i navngitte fylogenetiske grupper basert på Edvardsen et al. (2000) og Edvardsen et al. (innsendt). Disse gruppene er A (*Phaeocystis* spp.), B1-1 (*Chrysocampanula*), B1-2 (*Imantonia*), B1-3 (*Pseudohaptolina*), B1-4 (*Haptolina*), B1-5 (*Prymnesium*), B2 (Chrysochromulinaceae), C (Kokkolittoforider) og D (Ubeskrevet søstergruppe til *Phaeocystis*).

Tabell 2.3: Oversikt over kloningsreaksjoner, antall kloner sekvensert og antall vellykkede sekvenser (# brukt).

Kloningsnr	Preparatnr	PCR-nr	Primere	Stasjon	# kloner	# sekvensert	# brukt
LK3	P216	L11/4	1F + 1528R	62	64	64	61
LK3	P222 + P223	L11/5 + L11/6	1F + 1528R	69	32	32	25
LK4	P206 + P207	L11/1 + L11/2	1F + 1528R	54	64	64	20
LK4	P214	L11/3	1F + 1528R	59	64	64	46
LK4	P222 + P223	L11/5 + L11/6	1F + 1528R	69	56	56	30
LK5	P216	L14/1	Hapto4F + Euk34R	62	96	71	58
LK5	P223	L14/4	Hapto4F + Euk34R	69	96	68	57
LK6	P206	L15/1	Hapto4F + Euk34R	54	96	72	71
LK6	P214	L15/4	Hapto4F + Euk34R	59	96	69	64



## 2.5 Definerings av OTU (“Operational Taxonomic Unit”)

For å bestemme hvilket OTU-nivå som skulle benyttes (hvor like to sekvenser skal være før de regnes som én OTU), brukte jeg kjente sekvenser som jeg testet i to grupperingsprogrammer (“Clustering”-programmer). De to programmene som ble benyttet var CLOTU (Kumar et al., 2009) og MESA (Caron et al., 2009). Disse programmene grupperer sekvenser etter en sekvenslikhet angitt i prosent. Som representant for hver gruppe brukes den lengste sekvensen, og det er denne sekvensen som brukes videre i fylogenetiske analyser. I LSU rDNA-undersøkelsen benyttet jeg kjente svepeflagellatsekvenser ( $n = 55$ ), siden mine LSU rDNA-sekvenser stammer fra svepeflagellater. I SSU rDNA-undersøkelsen benyttet jeg BLAST-resultatene ( $n = 72$ ) fra mine egne sekvenser, for å forsikre meg om at testsekvensene var så like som mulig mine egne. Selve sammenligningen ble gjort ved at jeg la til et straffepoeng for hver art som ble feilplassert, og bestemte deretter *treffsikkerheten* til programmene ved hjelp av følgende formel:

$$Treffsikkerhet = \frac{n - f}{n} \quad (2.1)$$

Hvor  $n$  er antall sekvenser totalt og  $f$  er antall feilplasserte sekvenser. Antall suksesser er derfor gitt ved  $n - f$ , og andelen suksesser (treffsikkerheten) finner man ved å dele antall suksesser på antall sekvenser totalt ( $n$ ).

## 2.6 Numeriske analyser og datavisualisering

### 2.6.1 Artsrikhet og likhet mellom lokaliteter

For alle likhetsmål ble Simpsons indeks (Lennon et al., 2001) (basert på Simpson, 1949) benyttet (som anbefalt i Koleff et al., 2003). Rarefaction-analyser (Heck Jr et al., 1975) ble gjort ved hjelp av vegan-pakken (Oksanen et al., 2008) i R (R Development Core Team, 2008). En GNMDS-ordinasjon (“Global Non-metric Multidimensional Scaling”, Kruskal, 1964) ble gjennomført med én ordinasjonsakse for å undersøke eventuelle gradienter i taksonomisk avstand (likhet) mellom undersøkelsens fire stasjoner. Verktøyene for å gjennomføre GNMDS-ordinasjoner befinner seg også i Vegan-pakken i R. Også i dette tilfellet ble Simpsons indeks benyttet som distansemål mellom hvert par av stasjoner, dette fordi jeg ønsket å forholde meg til tilstede/ikke-tilstede-data også i GNMDS-analysen. Verdiene fra simpsonsindeksen ble også benyttet for å undersøke eventuell sammenheng mellom breddegrad og similaritet (se Harrison et al. 1992).

### 2.6.2 Kart og datavisualisering

Oversiktskartet i figur 2.1 er produsert i Matlab (MathWorks, 2010) ved hjelp av `m_map`-pakken (Pawlowicz, 2009). Konturplottene (figur 3.1–3.3, og 3.6) er basert på diskrete målinger, interpolering ble gjort med R-pakken `akima` (Akima et al., 2006). Posisjonen til polarfronten (APF) er hentet fra Moore et al. (1999). CTD-plottene (figur 3.4 og 3.5) har fått tilpasset en glatt kurve ved hjelp av loess-funksjonen (“Local Polynomial Regression Fitting”) i R.

## 3. Resultater

### 3.1 Hydrografiske forhold

#### 3.1.1 Fysiske parametre

Konturplott som viser fordeling av salinitet, temperatur og tetthet i de øverste 200 m kan sees i figurene 3.1 og 3.2a. Salinitetsplottet (figur 3.1a) viser en svak tendens til et mindre salt overflatelag, men det er ikke store forskjeller i salinitet (33,9 i overflaten ned til 100 m og 34,1–34,6 dypere enn 100 m). Temperaturplottet (figur 3.1b) viser en jevn reduksjon i temperatur med økende breddegrad, fra omtrent  $9,5^{\circ}\text{C}$  før polarfronten, via en brå overgang til omtrent  $2,5^{\circ}\text{C}$  i polarfronten, helt ned til  $-1,5^{\circ}\text{C}$  lengst sør. Det er minimal variasjon i temperatur med dypet (figur 3.1b viser for en gitt breddegrad at det er omtrent lik temperatur ved overflaten og ved 200 m). Tetthetsplottet (figur 3.2a) viser omtrent samme tendenser som salinitetsplottet, med noe lavere tetthet nord for polarfronten (APF) og i overflatelagene (50–100 m), men med en liten påvirkning fra de lave temperaturene lengst sør.

CTD-grafer fra de fire stasjonene kan sees i figur 3.4 og 3.5. Ved stasjon 59, 62 og 69 er det et svakt overflatelag (40–70 m) som er utelukkende bestemt av redusert salinitet (dette er tydelig i figur 3.4b og 3.5, hvor man kan se at temperatur ikke har noen påvirkning på tetthet). Profilen til stasjon 54 (figur 3.4a) er sannsynligvis ikke pålitelig siden tetthetskurven ikke er monotont stigende med dypet (tungt vann skal befinne seg dypere enn lett vann, noe som ikke er tilfelle i starten av kurven). Det er derfor sannsynlig at figur 3.4a ikke er representativ for hydrografien ved stasjon 54, og derfor ikke egnet for tolkning. Det er ellers verdt å merke seg at tallene her varierer meget lite, salinitetsdifferansen fra overflate til dypeste måling er 0,0011 og temperaturdifferansen er 0,0232.

#### 3.1.2 Kjemiske parametre

Konturplott som viser fordeling av fosfat, nitrogen og silikat i de øverste 200 m kan sees i figurene 3.2b og 3.3. For makronæringssaltene fosfat (figur 3.2b), nitrogen (figur 3.3a) og silikat (figur 3.3b), viser samtlige plott den samme trenden; lave verdier (fosfat  $\sim 1,6\ \mu\text{M}$ , nitrogen  $\sim 20\ \mu\text{M}$  og silikat  $\sim 15\ \mu\text{M}$ ) i hele området nord for polarfronten (APF) med en gradvis konsentrasjonsøkning sørover og med dypet (opp til  $\sim 2,5\ \mu\text{M}$  for fosfat,  $\sim 34\ \mu\text{M}$  for nitrogen og  $\sim 95\ \mu\text{M}$  for silikat). Det er altså høyest konsentrasjoner av næringssalter i dypet lengst sør, et område som er nært kontinentet. Her kommer næringsstoffer mot overflaten fra dypet (oppvelling). I alle konturplottene (også for fysiske parametre) er det en tydelig forskjell mellom nord og sør for polarfronten (APF).

CTD-grafene med *in vivo* fluorescens med dypet, viser et “klorofyllmaksima” i dybdeintervallet 30–100 m (se figur 3.4 og 3.5). Dette kan man også se i figurene 3.6a og 3.6b, hvor

det kommer tydeligere frem at “maksimumene” ikke er høye verdier (de er i området  $0,2\text{--}0,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), men større enn verdiene i dypet. Legg merke til at fluorescenskurven for stasjon 62 (figur 3.5a) har samme form som kurvene for de andre stasjonene, men verdiene har et mye større spenn (maksima for stasjon 62 er omtrent  $0,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , mens maksima ved de andre stasjonene er  $0,2\text{--}0,3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), noe som er tydeligere i figur 3.6.

Figurene 3.6a og 3.6b viser fordeling av klorofyll basert på henholdsvis *in vivo* fluorescensmålinger fra CTD-kast og *in vitro* klorofyll a-målinger av filtrerte vannprøver. Stort sett er det meget lave verdier ( $< 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), med noe høyere verdier ( $\sim 0,4\text{--}0,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) i området omkring stasjon 59 og stasjon 62, fra overflaten og ned til  $\sim 100\text{m}$ . I tillegg er det økte verdier i de øverste 100 m sør for  $65^\circ\text{S}$  (nærmere kontinentet).

## 3.2 Bestemmelse av OTU-nivå

Resultatene for de to dataprogrammene CLOTU og MESA (basert på formel 2.1 beskrevet i seksjon 2.5) kan sees i figur 3.7a for LSU rDNA og i figur 3.7b for SSU rDNA. De beste resultatene for programmene er tegnet inn med grå linjer.

Programmenes beste prestasjoner er oppsummert i tabell 3.1. Der kan man se at CLOTU presterer bedre enn MESA i begge tilfeller, spesielt når det gjelder LSU rDNA. Dette er også tydelig i grafene, hvor CLOTU konsekvent har høyere treffsikkerhet ved relevante verdier. Jeg har derfor benyttet CLOTU og nivåene nevnt i tabell 3.1 på mine egne sekvenser (oversikt over mine OTU'er kan sees i Appendix A.2).

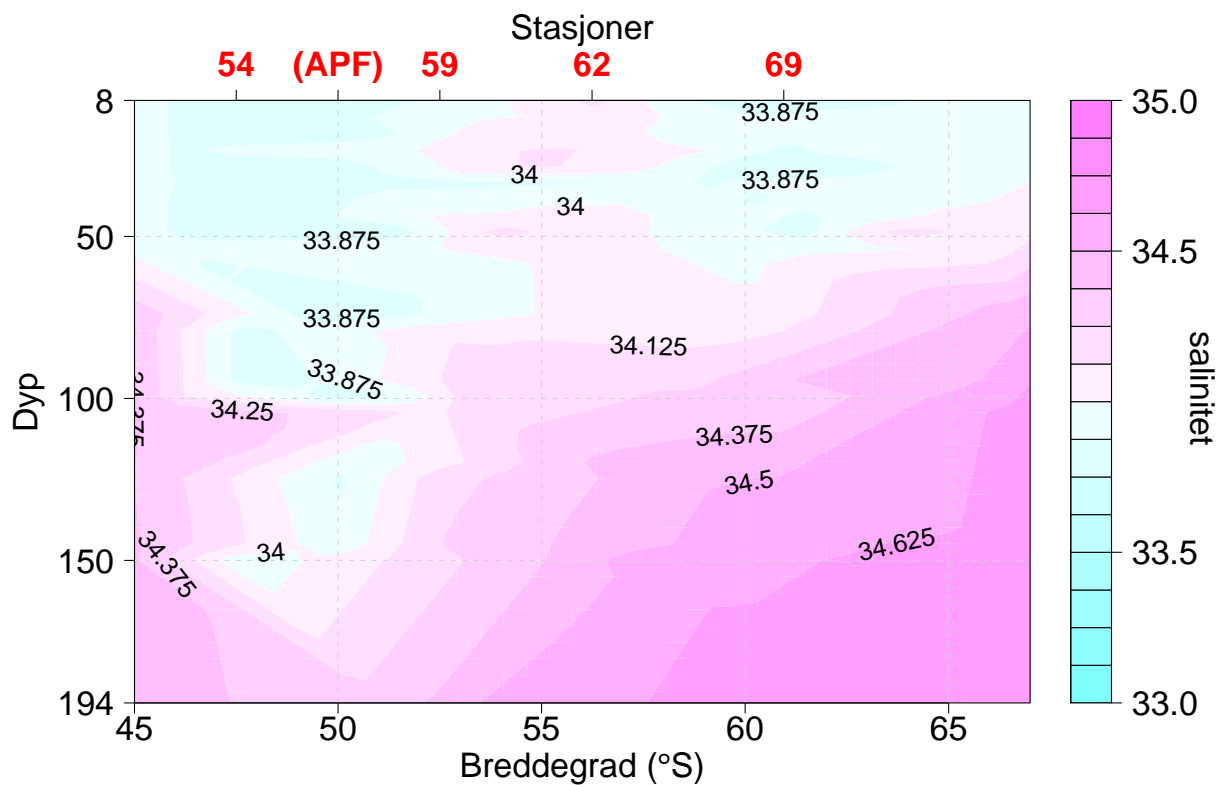
I tillegg til å undersøke treffsikkerheten var det nødvendig å foreta en subjektiv vurdering av programmenes resultater. Basert på treffsikkerhet er det allerede tydelig at CLOTU presterer bedre enn MESA. Dette inntrykket ble forsterket etter å ha sett på resultatene til begge programmene. CLOTU var konsekvent bedre til å plassere sekvenser i riktige grupper (ikke alle feilplasseringer er like ille, se neste avsnitt). Dette er også grunnen til at 99,5 % faktisk gir det beste resultatet for MESA i SSU rDNA-tilfellet (se figur 3.7b). Selv om treffsikkerheten øker for MESA etter dette punktet blir kvaliteten på grupperingene redusert. Både gode (korrekte) og dårlige grupperinger deles opp ved økte likhetskrav, noe som betyr at feil i forbindelse med treffsikkerhet oppstår ved splitting av gode grupper, mens feil forsvinner ved splitting av dårlige grupper. Derfor kan treffsikkerhetsformelen bli noe misvisende ved veldig høye verdier.

Et eksempel på prestasjonen til de to programmene for SSU rDNA ved 99 % sekvenslikhet (nivået jeg har valgt for SSU rDNA), kan finnes i appendixet i tabell A.1 og A.2. Her kommer det også frem hvorfor jeg har valgt CLOTU selv om treffsikkerheten for SSU rDNA er ganske lik for de to programmene. Feilene i MESA dukker opp ved plassering av forskjellige slekter i samme gruppe, CLOTU har færre feil generelt og spesielt færre feil av denne sorten. Verdifull informasjon kan gå tapt ved å plassere forskjellige slekter sammen, så selv om CLOTU gir en høyere artsrikhet ønsket jeg å ta vare på mest mulig informasjon. Den høyere artsrikheten er sannsynligvis ikke et problem, i det nevnte eksempelet gir CLOTU bare én art mer enn hva som er korrekt.

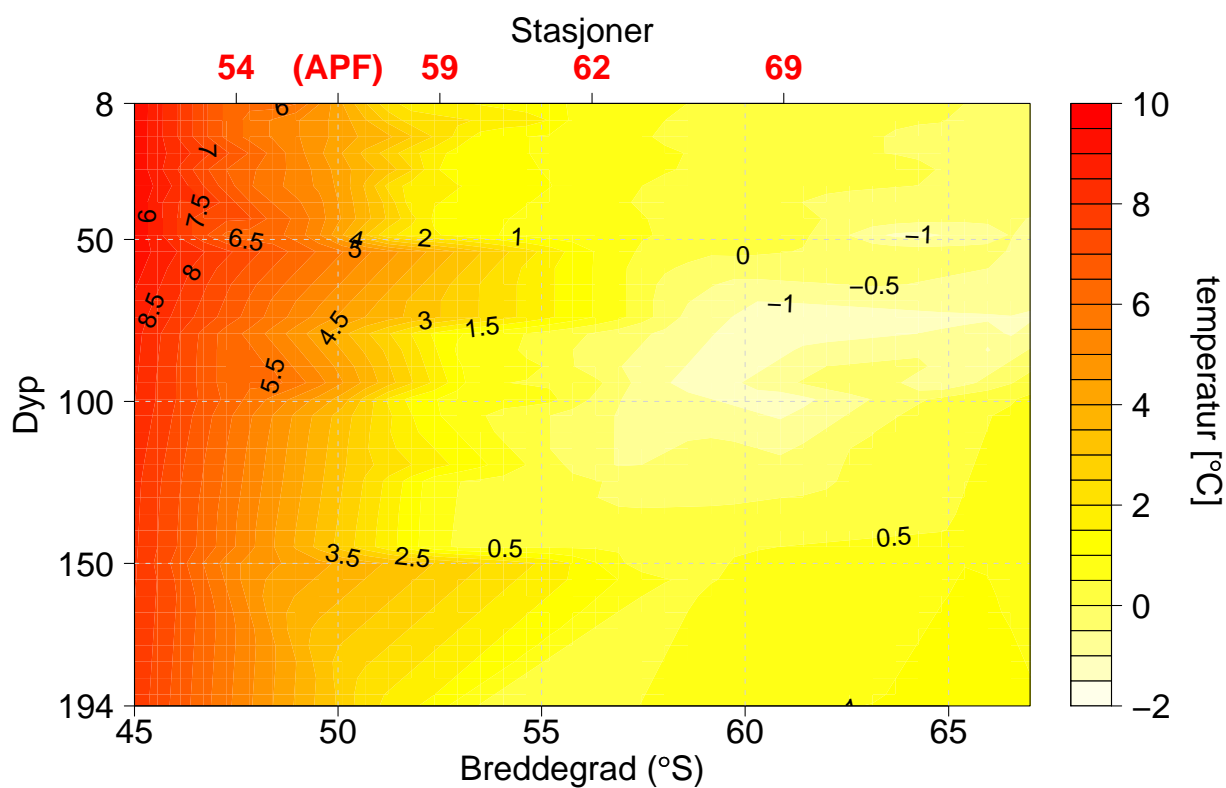
## 3.3 Taksonomisk fordeling basert på SSU rDNA-sekvenser

Figur 3.9–3.11 viser “Maximum Likelihood” (ML)-trær for alle SSU rDNA-sekvensene, sammen med henholdsvis Haptophyta-, Stramenopila- og Dinophytasekvenser. Eukaryoter som ikke er innenfor Haptophyta, Dinophyta, Stramenopila, eller som ikke havner under betegnelsen fotosyntetiserende protister, er ikke videre undersøkt i denne oppgaven. Tabell 3.2 og søyledia-

(a)

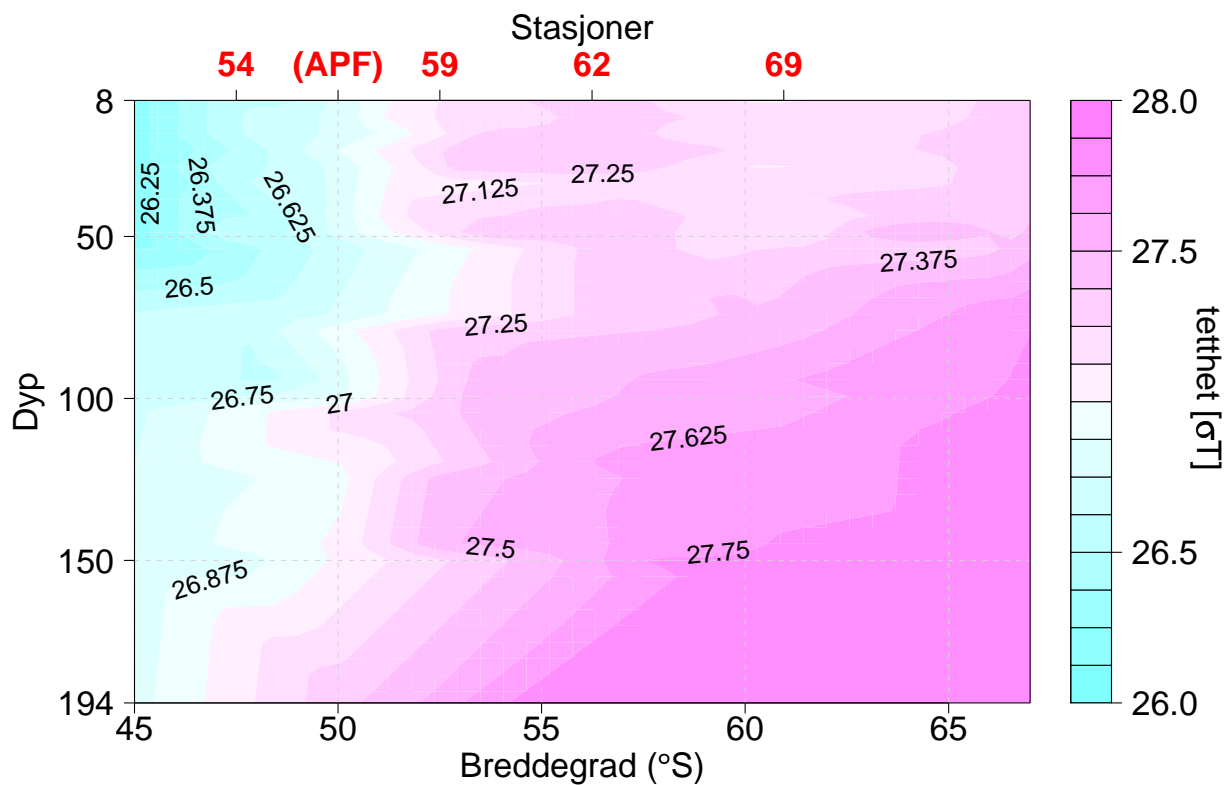


(b)

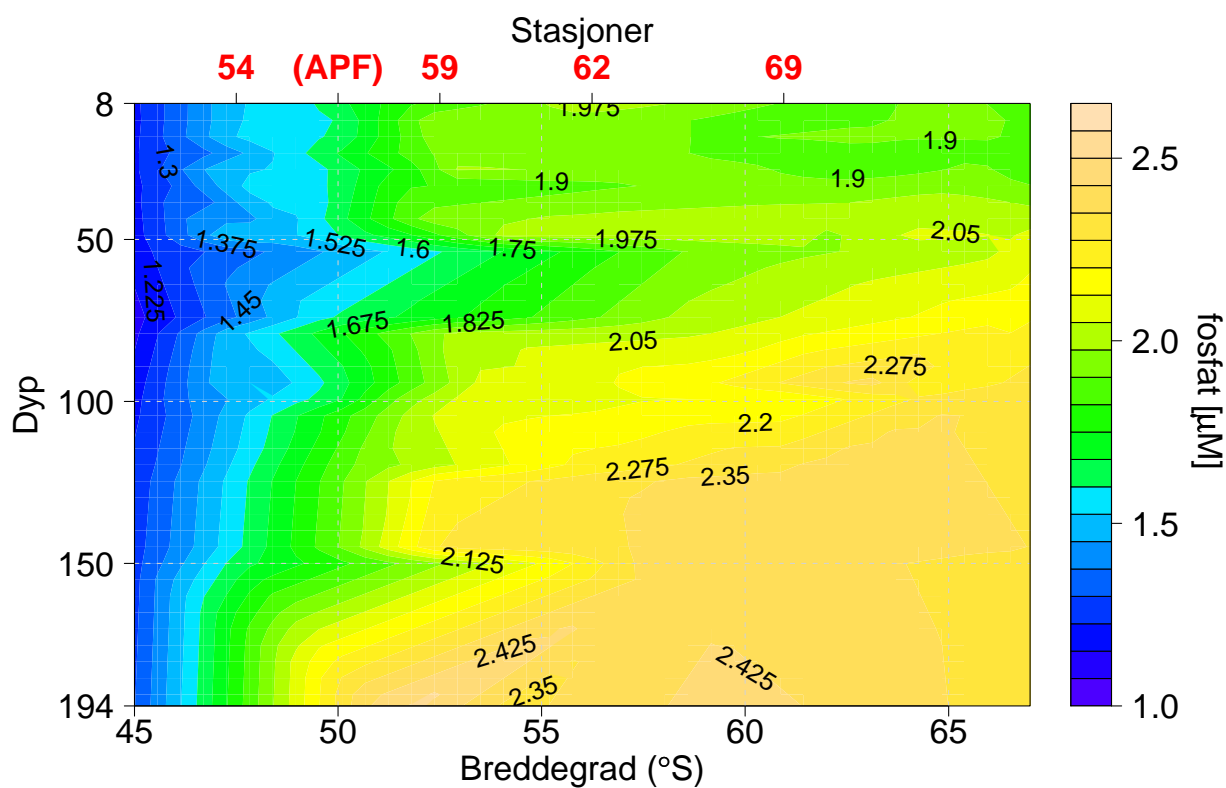


Figur 3.1: Konturplott som viser fordeling av salinitet (a) og temperatur (b) med dyp og breddegrad. Stasjoner og den antarktiske polarfront (APF) er markert øverst.

(a)

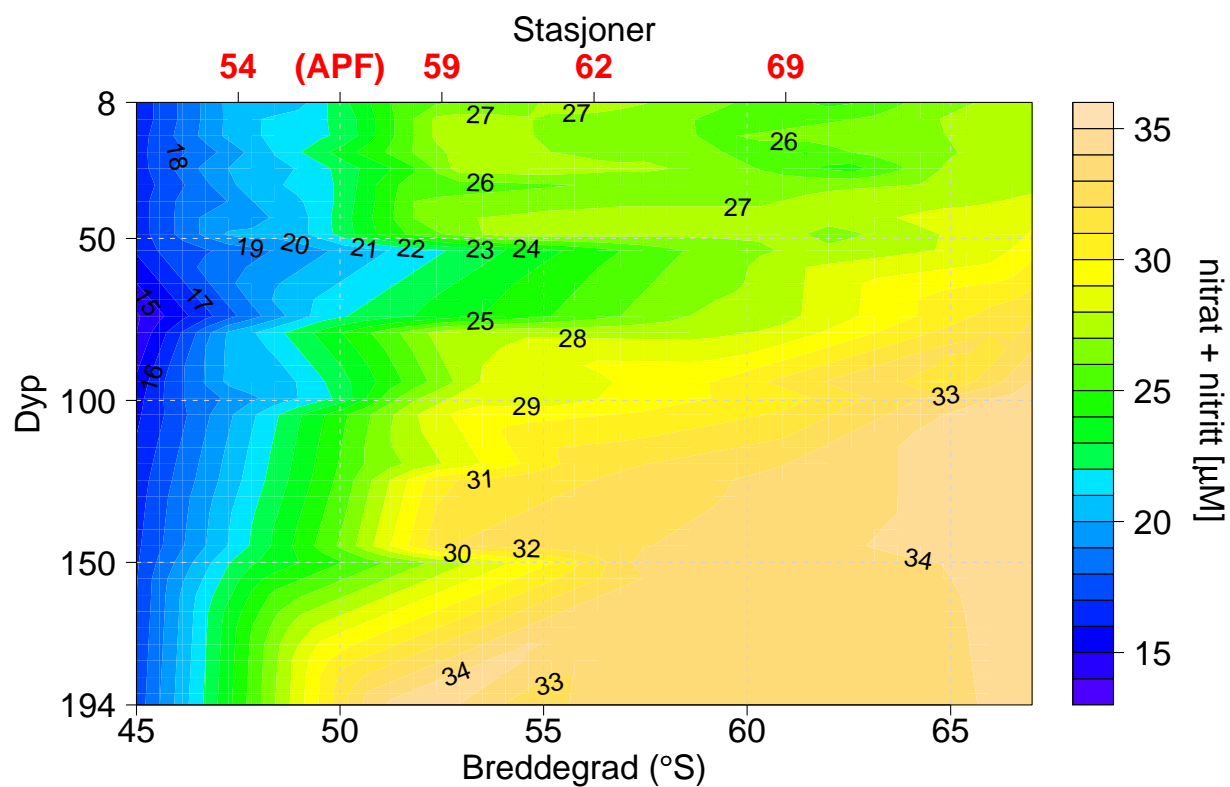


(b)

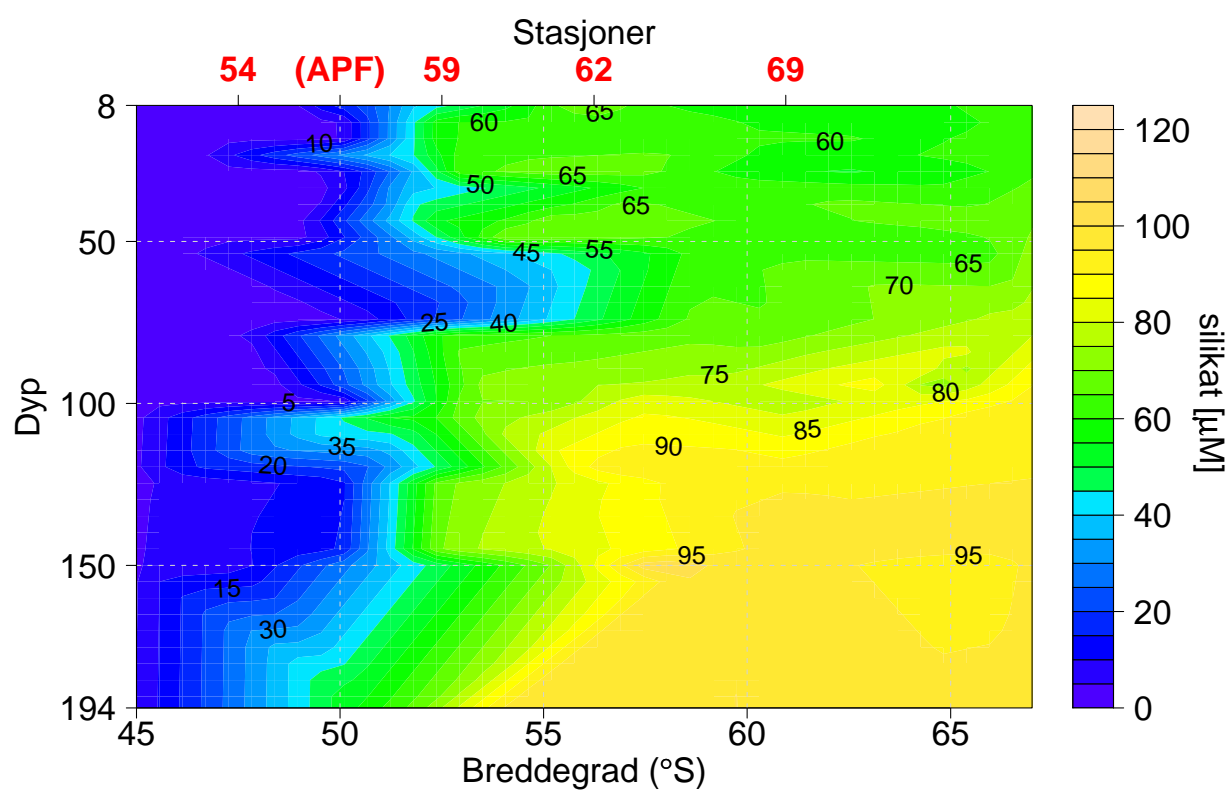


Figur 3.2: Konturplott som viser fordeling av tetthet (a) og fosfat (b) med dyp og breddegrad. Stasjoner og den antarktiske polarfront (APF) er markert øverst.

(a)

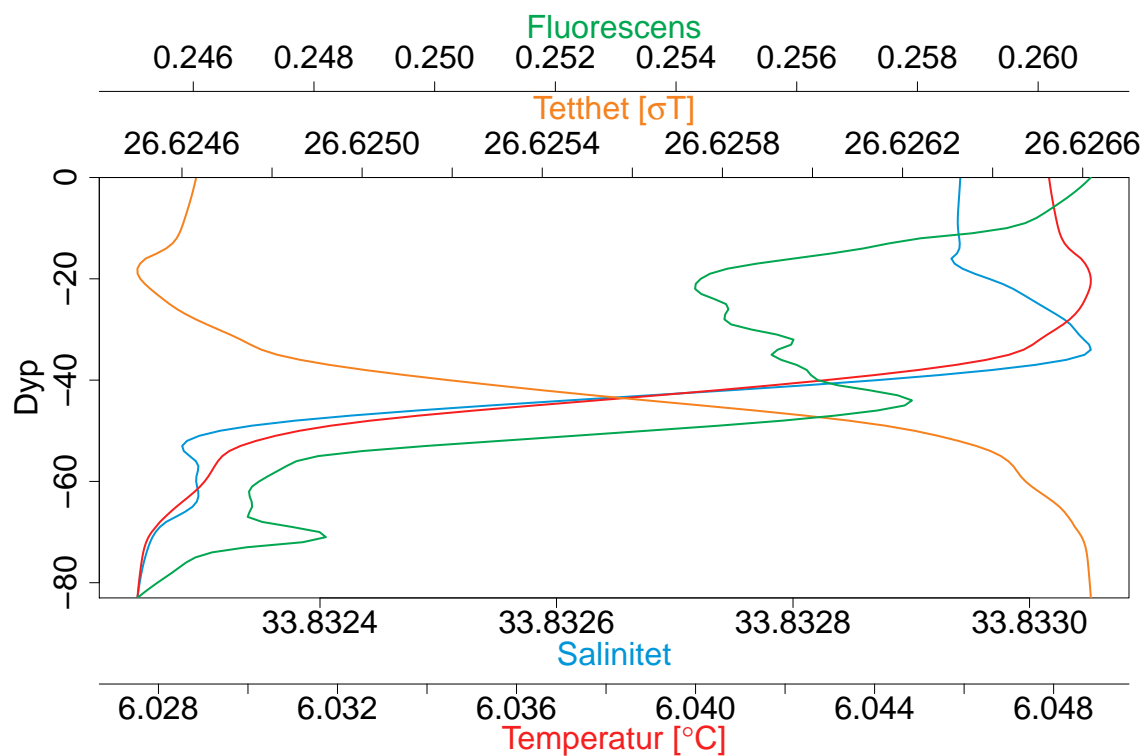


(b)

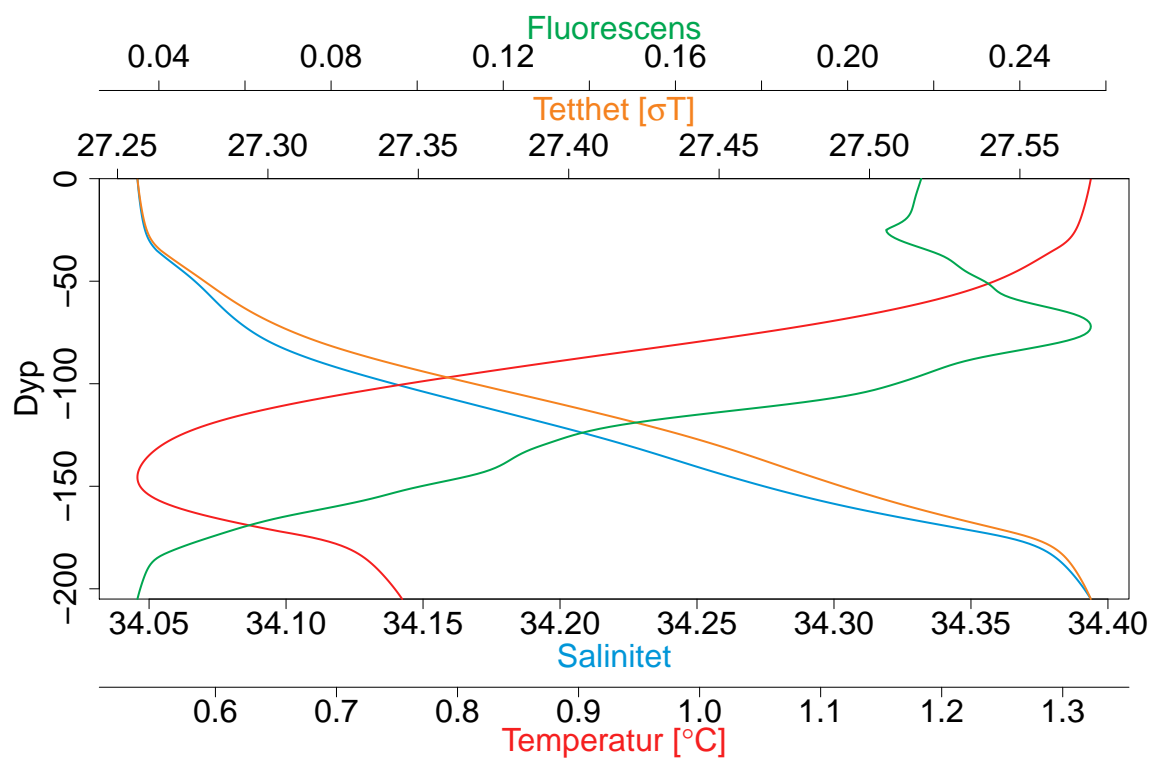


Figur 3.3: Konturplott som viser fordeling av nitrogen (a) og silikat (b) med dyp og breddegrad. Stasjoner og den antarktiske polarfront (APF) er markert øverst.

(a)

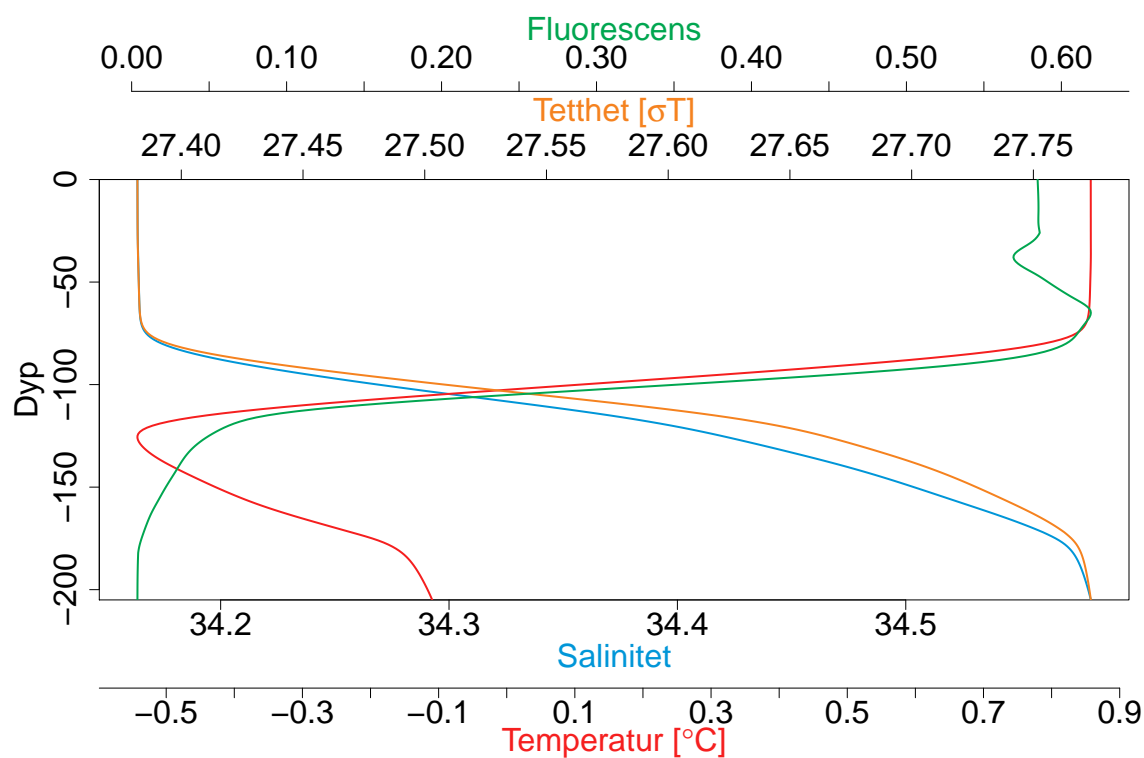


(b)

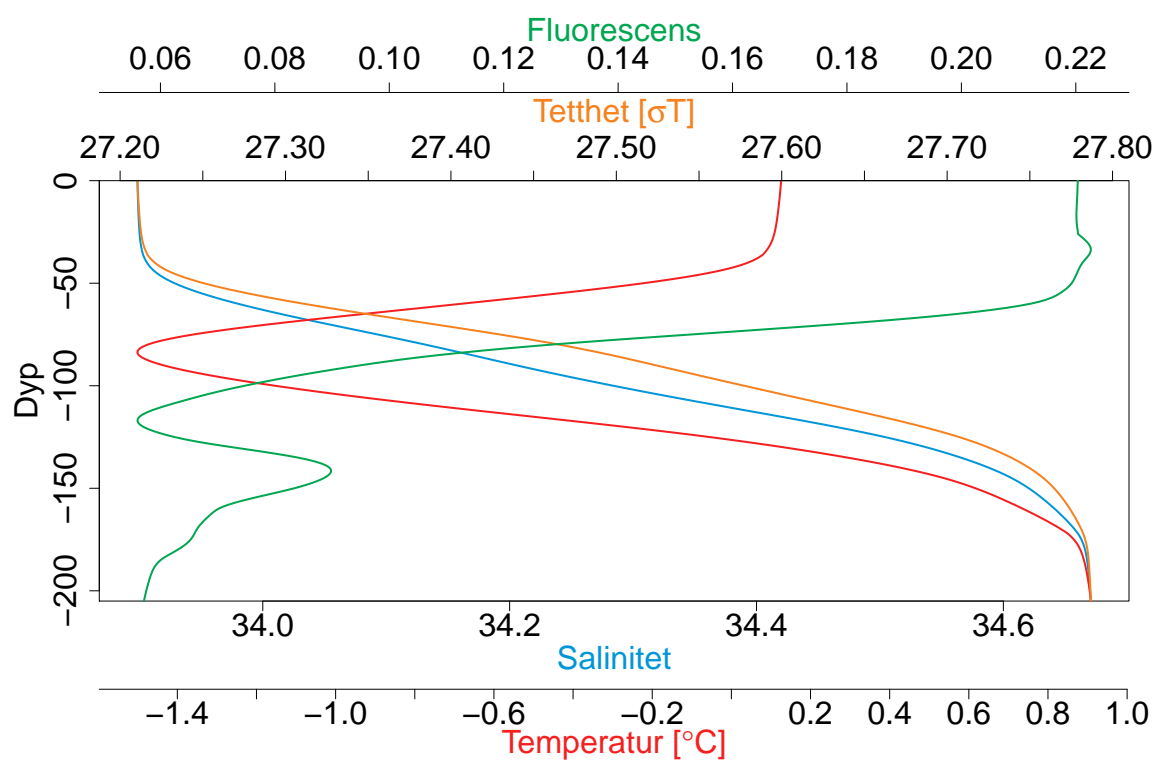


Figur 3.4: Fordeling av temperatur, salinitet og fluorescens i de øverste 80 m ved stasjon 54 (a), og de øverste 200 m ved stasjon 59 (b). Datapunktene har blitt tilpasset en glattingsfunksjon for å gjøre figurene mer oversiktlige.

(a)



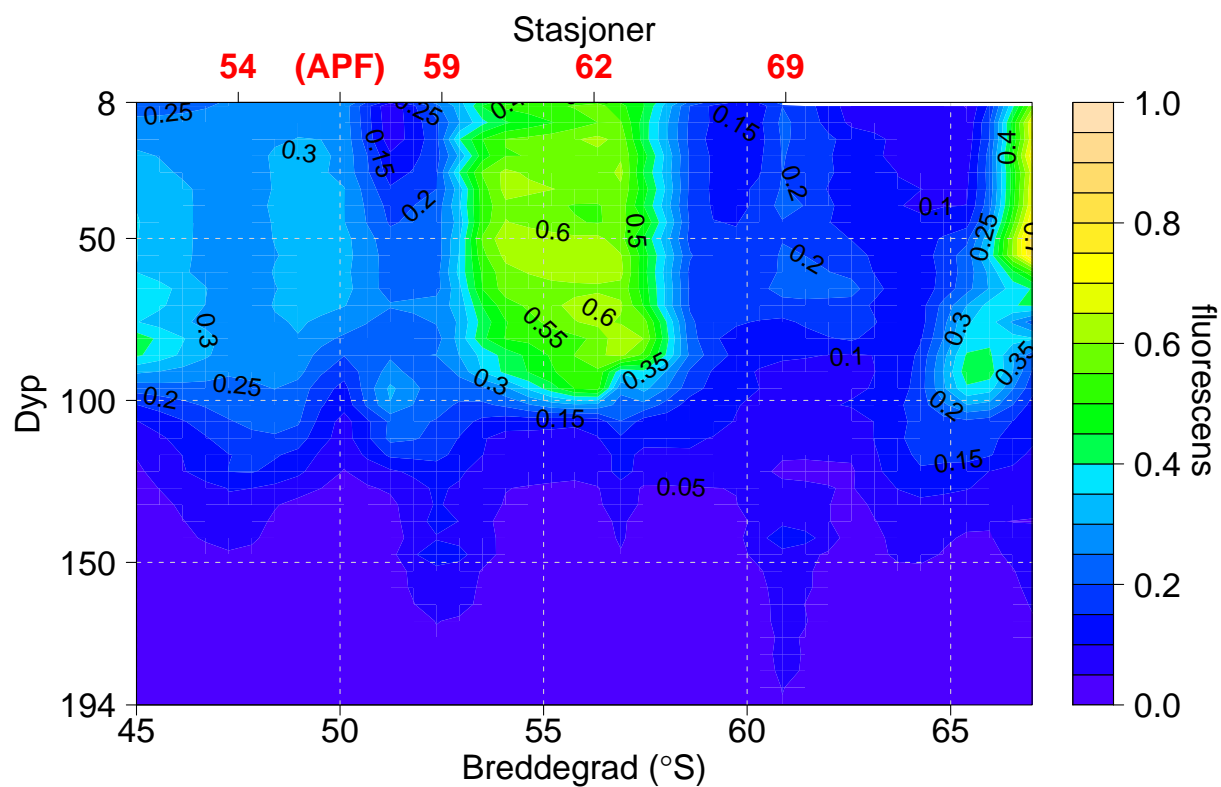
(b)



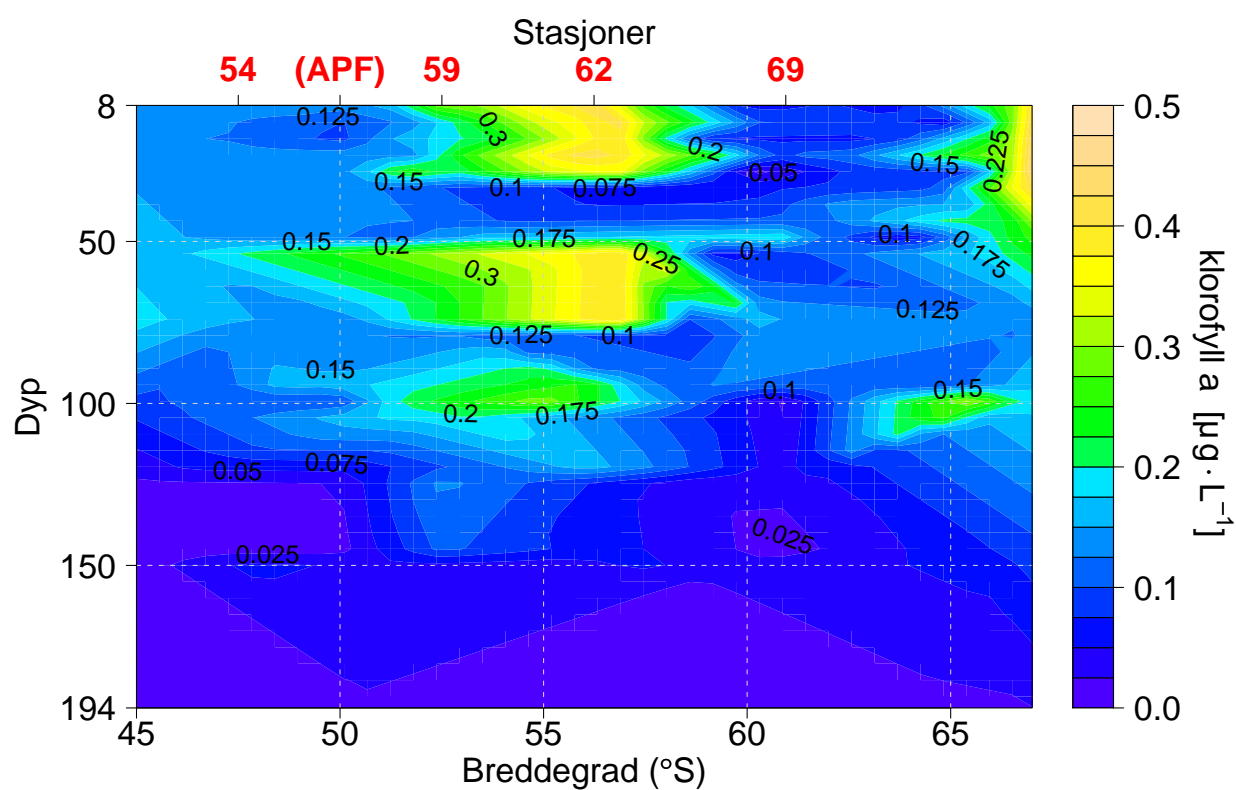
Figur 3.5: Fordeling av temperatur, salinitet og fluorescens i de øverste 200 m ved stasjon 62 (a) og 69 (b). Datapunktene har blitt tilpasset en glattingsfunksjon for å gjøre figurene mer oversiktlige.



(a)

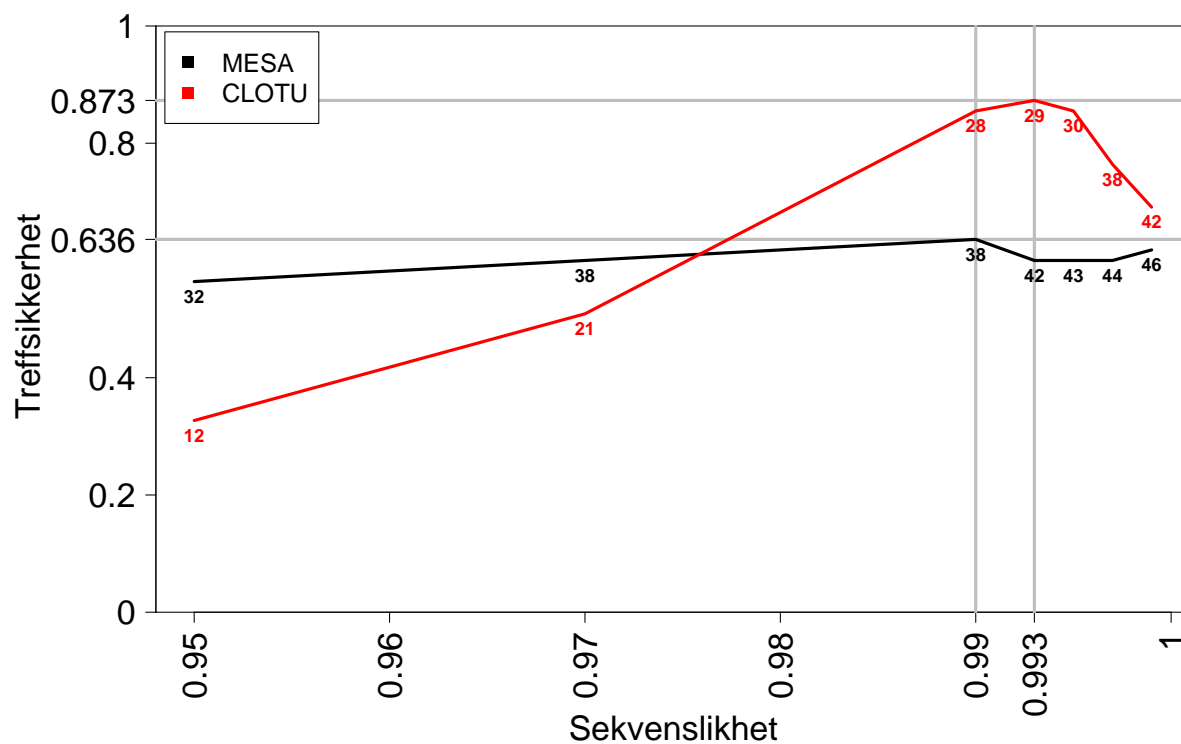


(b)

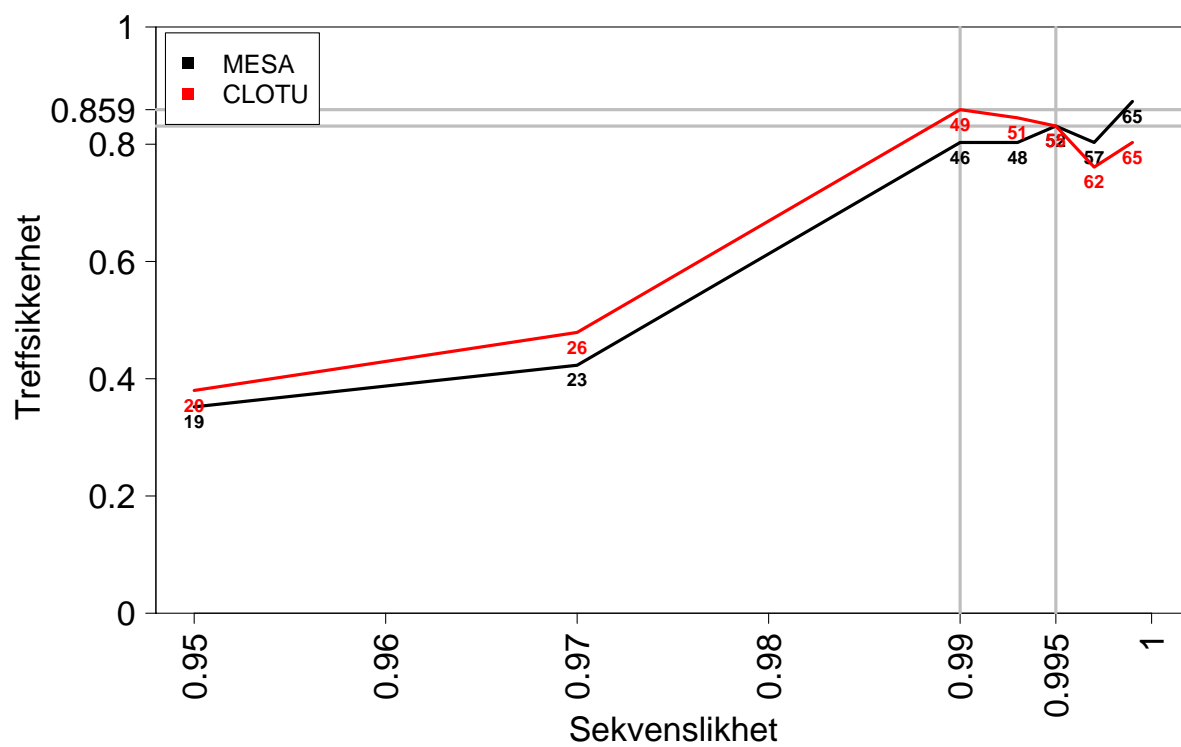


Figur 3.6: Konturplott som viser klorofyllfordeling med dyp og breddegrad; a) *in vivo* fluorescens og b) klorofyll *a* (*in vitro*). Stasjoner og den antarktiske polarfront (APF) er markert øverst.

(a)



(b)



Figur 3.7: Sammenligning av treffsikkerheten til programmene CLOTU og MESA for LSU rDNA-sekvenser (a), og SSU rDNA-sekvenser (b).

Tabell 3.1: Sekvenslikhetene som gir best treffsikkerhet for CLOTU og MESA.

Ribosomalenheter	Sekvenslikhet		Treffsikkerhet	
	CLOTU	MESA	CLOTU	MESA
Den store subenheten (LSU)	99,3 %	99,0 %	87,3 %	63,6 %
Den lille subenheten (SSU)	99,0 %	99,5 %	85,9 %	83,1 %

grammene i figur 3.8 viser at de aller fleste sekvensene tilfaller Dinophyta (111 sekvenser, 61 %), fulgt av Stramenopila (37 sekvenser, 20 %) og Haptophyta (18 sekvenser, 10 %). Ved de stasjonene hvor det ble oppdrevet mange sekvenser fra én gruppe, representerte disse sekvensene også mange OTU'er (antall OTU'er fulgte antall sekvenser, se figur 3.8).

Av de 18 sekvensene som grupperer seg med svepeflagellatene er det kun to sekvenser som ikke har stor likhet med *Phaeocystis* spp. (figur 3.9). Den ene av disse to sekvensene (SSU48) tilfaller B2-gruppen (Chrysochromulinaceae), og den andre (SSU53) tilhører D-gruppen (ubeskrevet søstergruppe av *Phaeocystis*). Nøyaktig hvilke *Phaeocystis*-arter mine sekvenser representerer er vanskelig å bestemme, siden støtteverdiene innad i *Phaeocystis*-gruppen er lave ( $\leq 0$ ) og viser at plasseringene her er usikre.

Blandt stramenopilsekvensene (figur 3.10) er det stor overvekt av sekvenser fra kiselalger (28 sekvenser, 76 %), med noen sekvenser fra klassen Pelagophyceae (7 sekvenser, 19 %) og to sekvenser fra heterotrofe grupper av Stramenopila. Det er tre av kiselalge-OTU'ene som ikke ligner på kjente sekvenser (SSU02, SSU20 og SSU26), SSU02 representerer 16 sekvenser, flest av stramenopil-OTU'ene. Fra BLAST ser det ut til at kiselalgen AY485478 *Minutocellus polymorphus* og en ukjent eukaryot (AB191429) deler størst sekvenslikhet med de tre sekvensene, men "Maximum Likelihood"-treet plasserer ikke disse sekvensene sammen (ML-treet plasserer *Chaetoceros* spp. som nærmeste slektning).

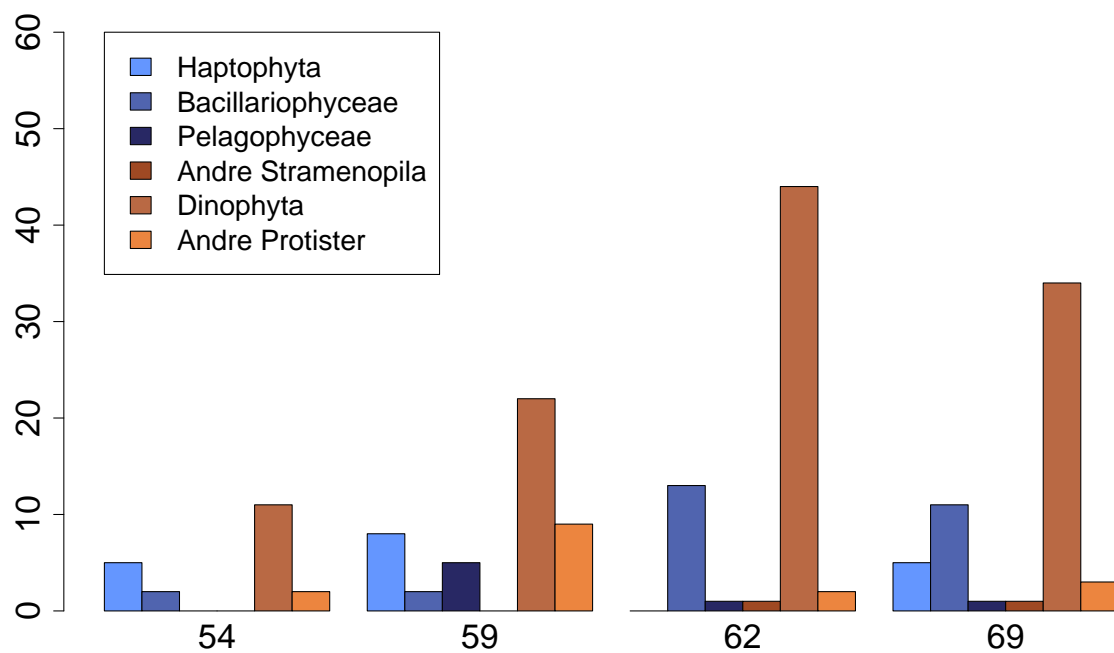
Dinophytatreet (figur 3.11) viser en ganske stor diversitet blandt dinoflagellatsekvenser, men med én dominerende OTU (SSU01) som representerer 68 sekvenser. Denne OTU'en er plassert nærmest "Dinophyceae sp.", altså ligner den ikke markant på noen kjent dinoflagellatsekvens. Det samme gjelder de fleste andre dinoflagellatsekvensene, som stort sett havner sammen med sekvenser fra ubeskrevne arter.

Figur 3.8 viser også en variasjon mellom stasjonene, spesielt andelen dinoflagellatsekvenser (og OTU'er) ser ut til å øke i omfang med økende breddegrad. Når det gjelder de andre gruppene er det her så få sekvenser at det ikke vil være grunnlag for å beskrive noen trender.

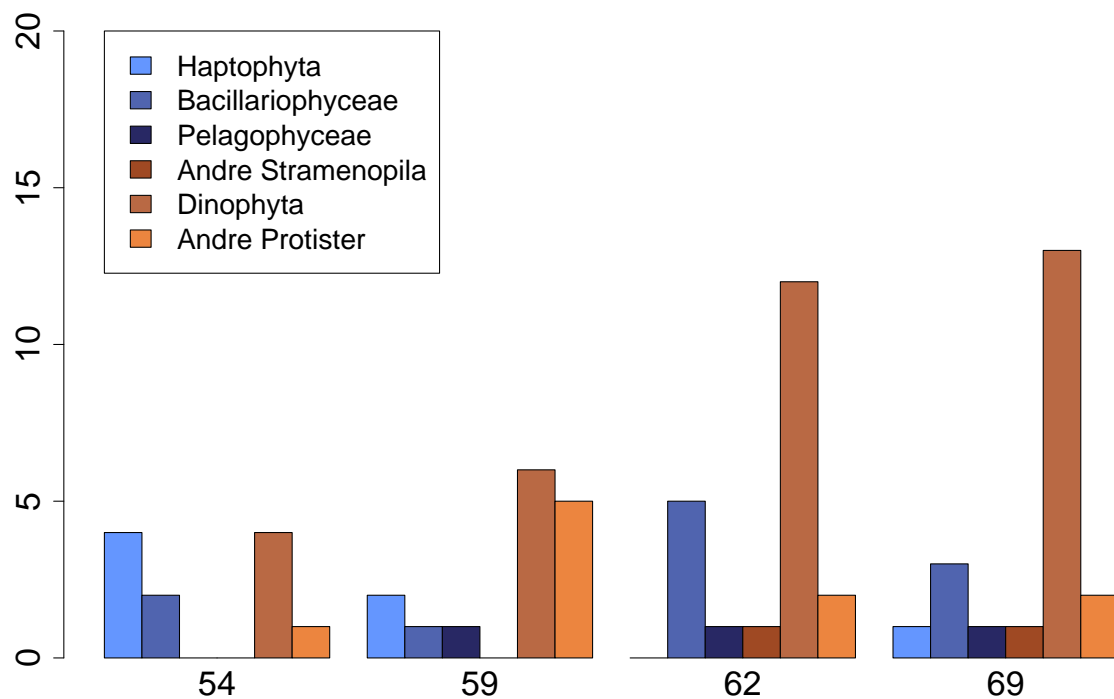
Tabell 3.2: Fordeling av SSU rDNA-sekvenser og OTU'er blandt divisjoner.

Gruppe	Antall sekvenser	Antall OTU'er
Haptophyta	18	5
Ochrophyta	37	11
Dinophyta	111	30
Andre eukaryoter	16	8

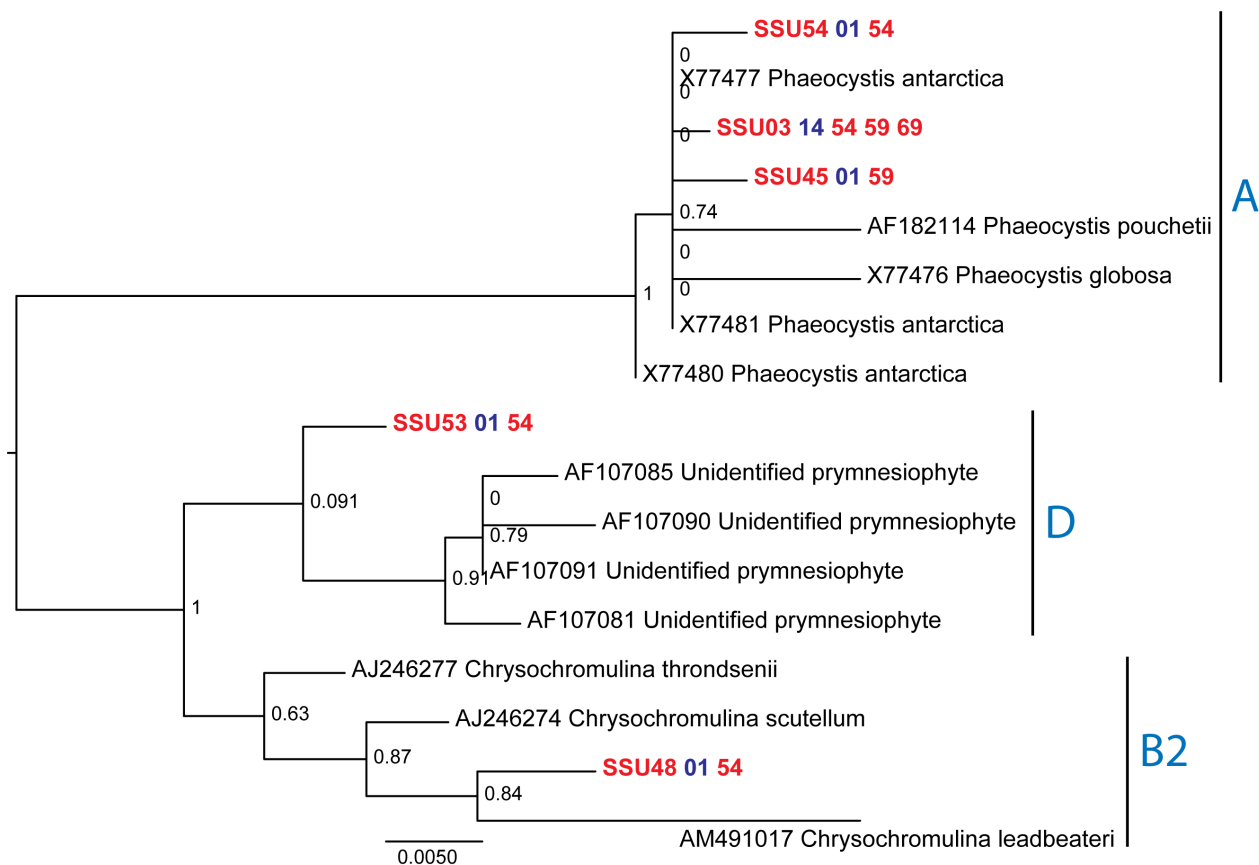
(a)



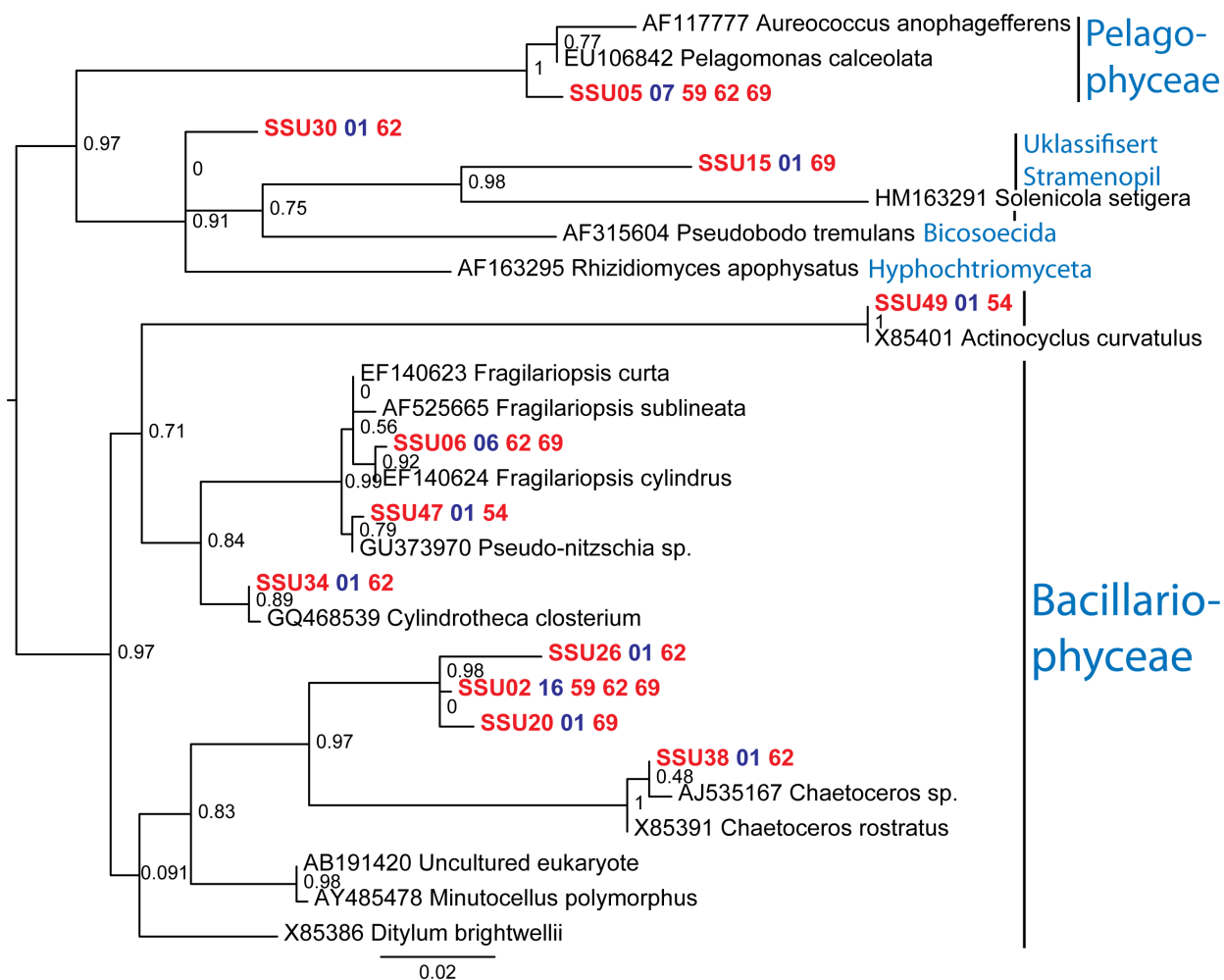
(b)



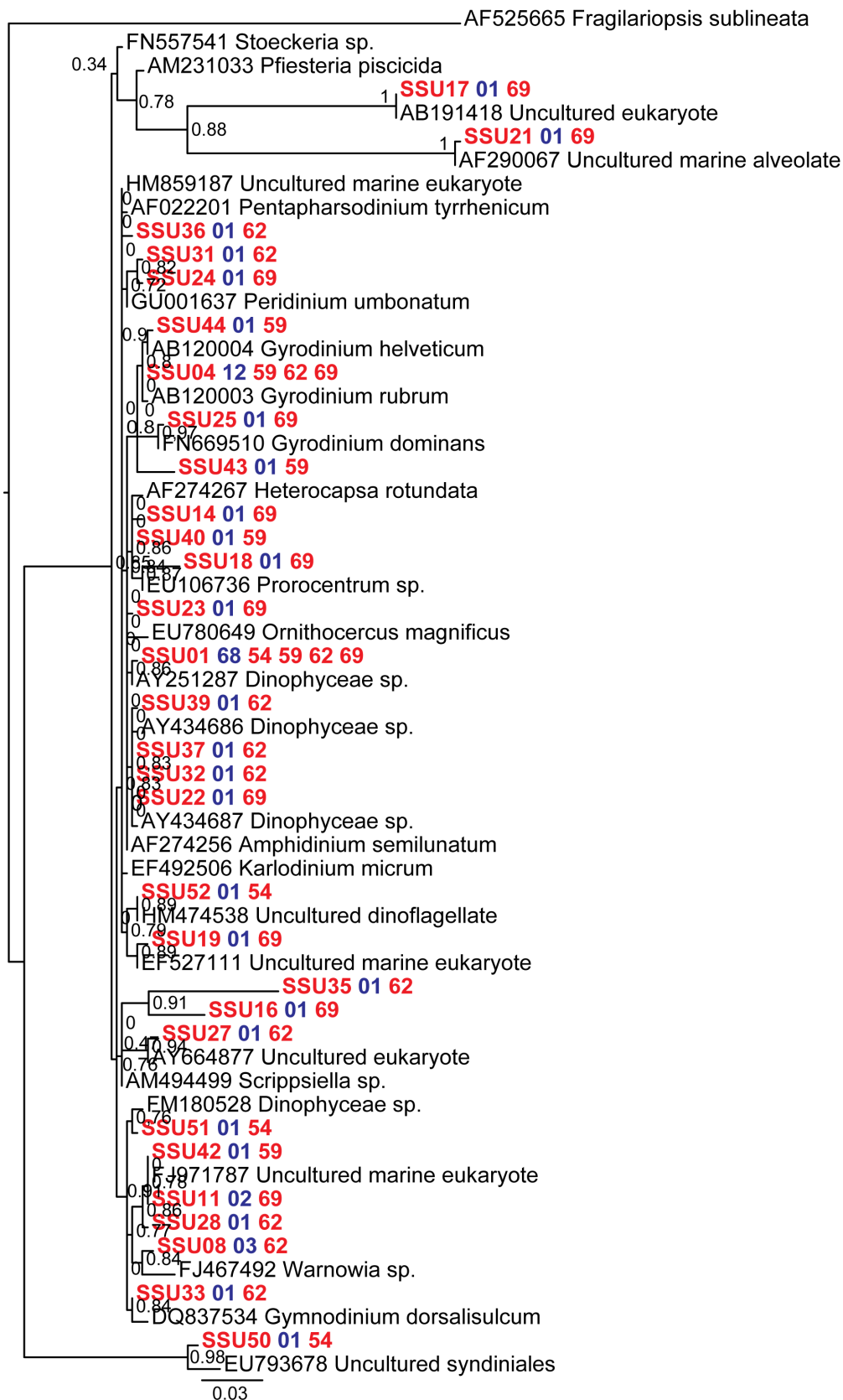
Figur 3.8: Fordeling av SSU rDNA-sekvenser (a) og SSU rDNA-OTU'er (b) blandt stasjoner og dominerende algegrupper.



Figur 3.9: Haptophyta “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på SSU rDNA-OTU’er sammen med sekvenser fra gendatabaser identifisert i BLAST. OTU-navnene består av et unikt navn (i rødt), antall sekvenser i OTU’en (lilla) og ved hvilke stasjoner OTU’en ble observert (også rødt). A = *Phaeocystis*, B2 = *Chrysochromulinaceae* og D = Ubeskrevet gruppe.



Figur 3.10: Stramenopila “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på SSU rDNA-OTU’er sammen med sekvenser fra gendatabaser identifisert i BLAST. Se figur 3.9 for forklaring av navn på OTU’er.



Figur 3.11: Dinophyta “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på SSU rDNA-OTU’er sammen med sekvenser fra gendatabaser identifisert i BLAST. Kiselalgen *Fragilariopsis sublineata* er med som utgruppe. Se figur 3.9 for forklaring av navn på OTU’er.

## 3.4 Taksonomisk fordeling basert på LSU rDNA-sekvenser

Figur 3.13–3.17 viser “Maximum Likelihood” (ML)-trær for alle LSU rDNA-sekvensene sammen med kjente Haptophyta-sekvenser. Figur 3.13 oppsummerer samtlige LSU rDNA-sekvenser sammen med flesteparten av dagens kjente LSU rDNA-sekvenser, mens figur 3.14, 3.15, 3.16 og 3.17 er stasjonsspesifikke (og har kun med nærmeste slektninger som referanse). Formålet med LSU rDNA-analysene var å spesifikt oppformere svepeflagellat-DNA. LSU rDNA-sekvenser som ikke tilhører svepeflagellater er derfor utelatt fra oppgaven. Tabell 3.3 viser at selv ved bruk av svepeflagellatspesifikke primere dukket det opp et stort antall sekvenser fra andre grupper (for det meste ciliater og kiselalger).

Det dukker generelt opp svepeflagellater fra to grupper (“clades”), B2 og D (beskrevet i seksjon 2.4), i tillegg til én kokkolittoforidesevens (LSU26), se tabell 3.3. Det er en total dominans av B2-gruppen (Chrysochromulinaceae) ved stasjon 54, både i antall sekvenser og OTU’er (se figur 3.12). Ved stasjonene sør for polarfronten (59, 62 og 69) er det D-gruppen (søstergruppe til *Phaeocystis*) som dominerer. Det er ingen store forskjeller mellom stasjonene sør for polarfronten i sekvensdataene. Dominansen av D-gruppen er overraskende ved sammenligning med SSU rDNA-resultatene (figur 3.9), hvor de fleste svepeflagellatsekvensene (78 %) befinner seg i gruppe A (*Phaeocystis* spp.). Man skulle forvente at de samme sekvensene ville ha dukket opp i LSU rDNA-analysen, men ingen av mine LSU rDNA-sekvenser havner i denne gruppen.

Tabell 3.3: Fordeling av LSU rDNA-sekvenser og OTU’er blandt svepeflagellatgrupper.

Gruppe	Antall sekvenser	Antall OTU’er
B2: Chrysochromulinaceae	92	29
D: Ubeskrevet gruppe	91	12
C: Kokkolittoforider	1	1
Ikke-svepeflagellater	66	26

## 3.5 Diversitet og OTU-fordeling

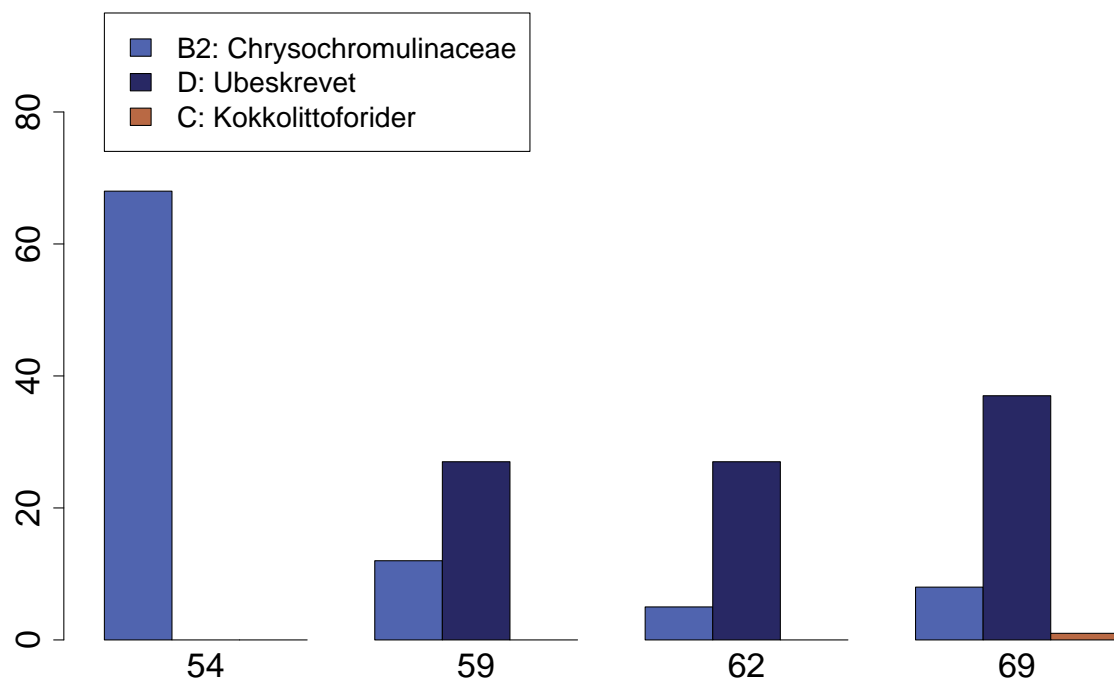
### 3.5.1 Artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet)

Siden to prøvestørrelser sjelden blir helt like, er det hensiktsmessig å forsøke å standardisere rikheten mellom prøver. Dette kan gjøres på to måter; (i) interpolere artsrikheten i en gitt prøve basert på kjente verdier og (ii) ekstrapolere artsrikhet basert på en gitt prøve. Alternativ (i) forholder seg kun til det vi vet, mens alternativ (ii) forsøker å estimere noe nytt basert på det vi vet. Jeg har kun benyttet metode (i) for å forsøke å avdekke eventuelle forskjeller/likheter mellom undersøkelsens fire stasjoner. Grunner til at jeg ikke har benyttet metode (ii) finnes i diskusjonen.

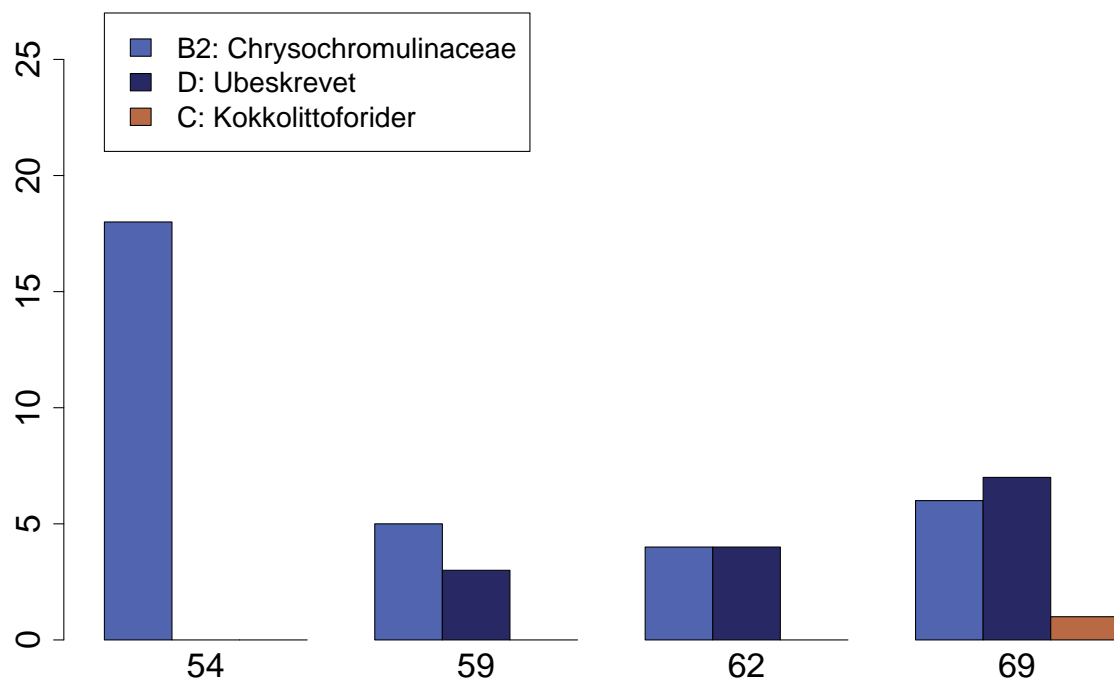
Rarefaction er et eksempel på metode (i). Her finner man først den minste prøvestørrelsen (i mitt tilfelle 57 sekvenser for LSU rDNA og 20 for SSU rDNA). Deretter forsøker man å estimere artsrikhet i de andre prøvene *dersom* de hadde vært like små som denne minste prøven. Man vil f.eks. estimere hvor mange LSU rDNA-OTU’er man ville ha funnet ved stasjon 54 dersom man hadde hatt 57 sekvenser og ikke 71 som er tilfellet. Resultater fra rarefaction-analyser kan sees i tabell 3.4 og 3.5, og figur 3.18a og 3.18b. Som begge tabellene viser er det ingen stor forskjell i artsrikhet etter rarefaction har blitt anvendt (man kan også se at kurvene ligger veldig nær



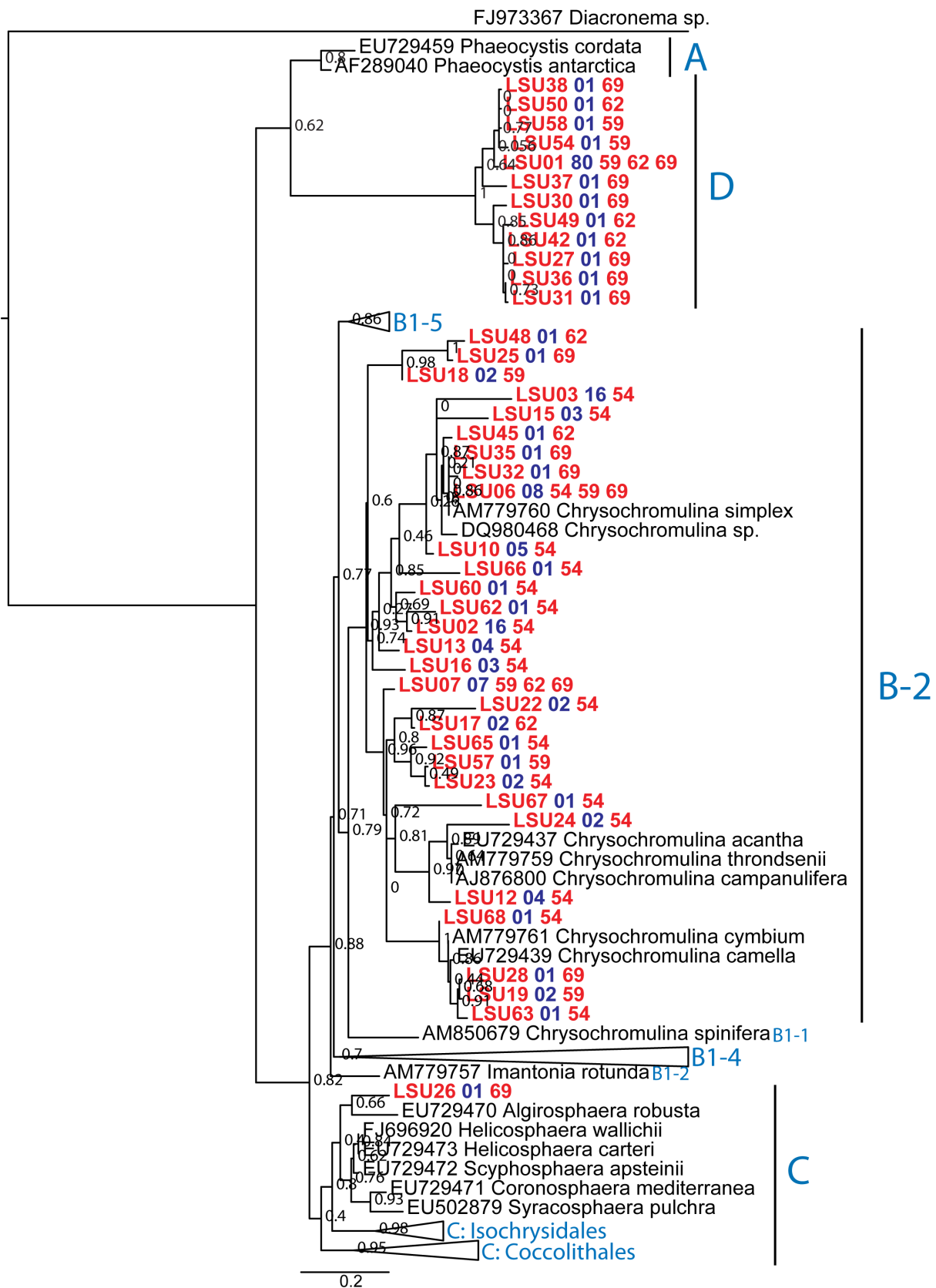
(a)



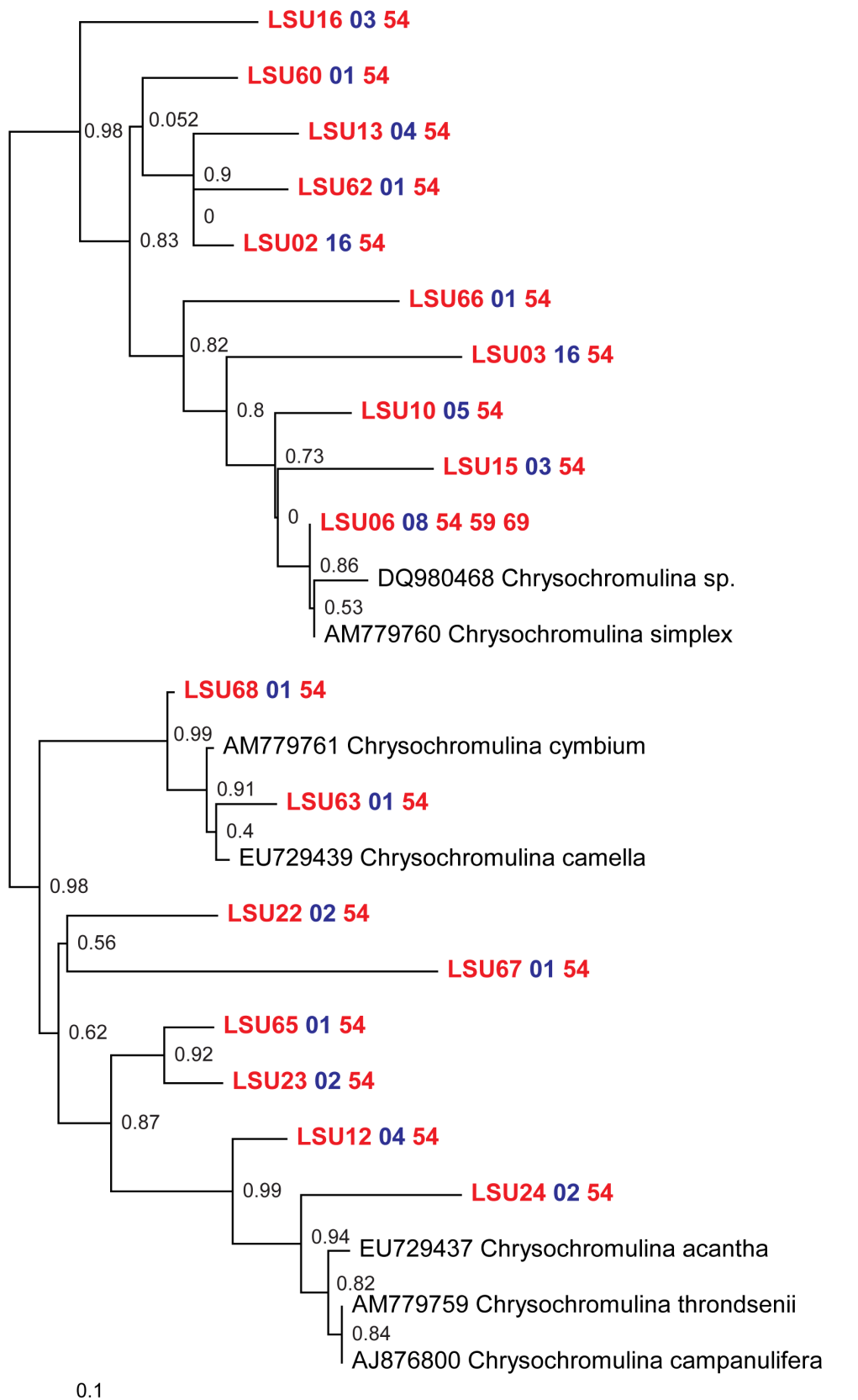
(b)



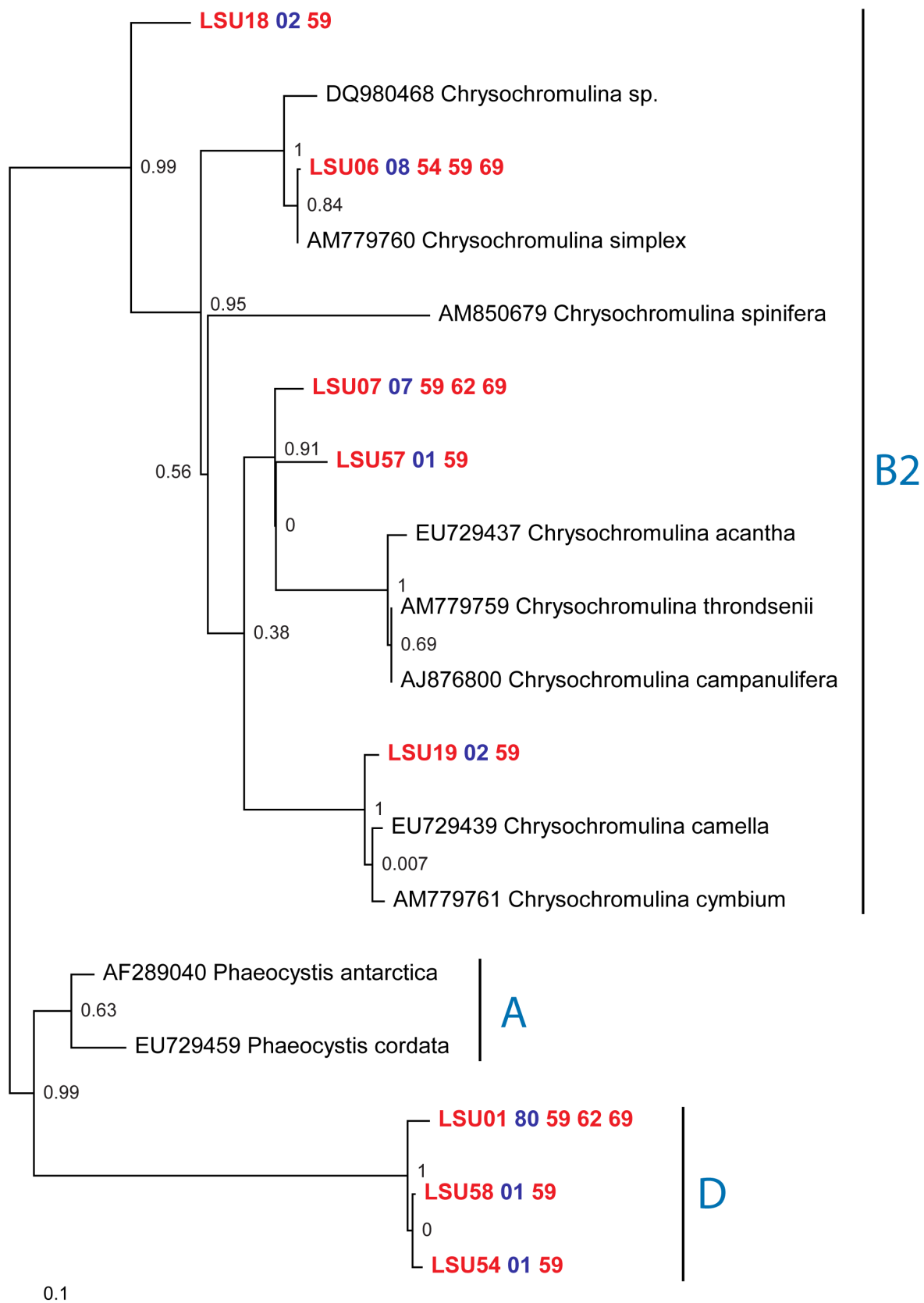
Figur 3.12: Fordeling av LSU rDNA-sekvenser (a) og LSU rDNA-OTU'er (b) blandt stasjoner og svepeflagellatgrupper ("clades").



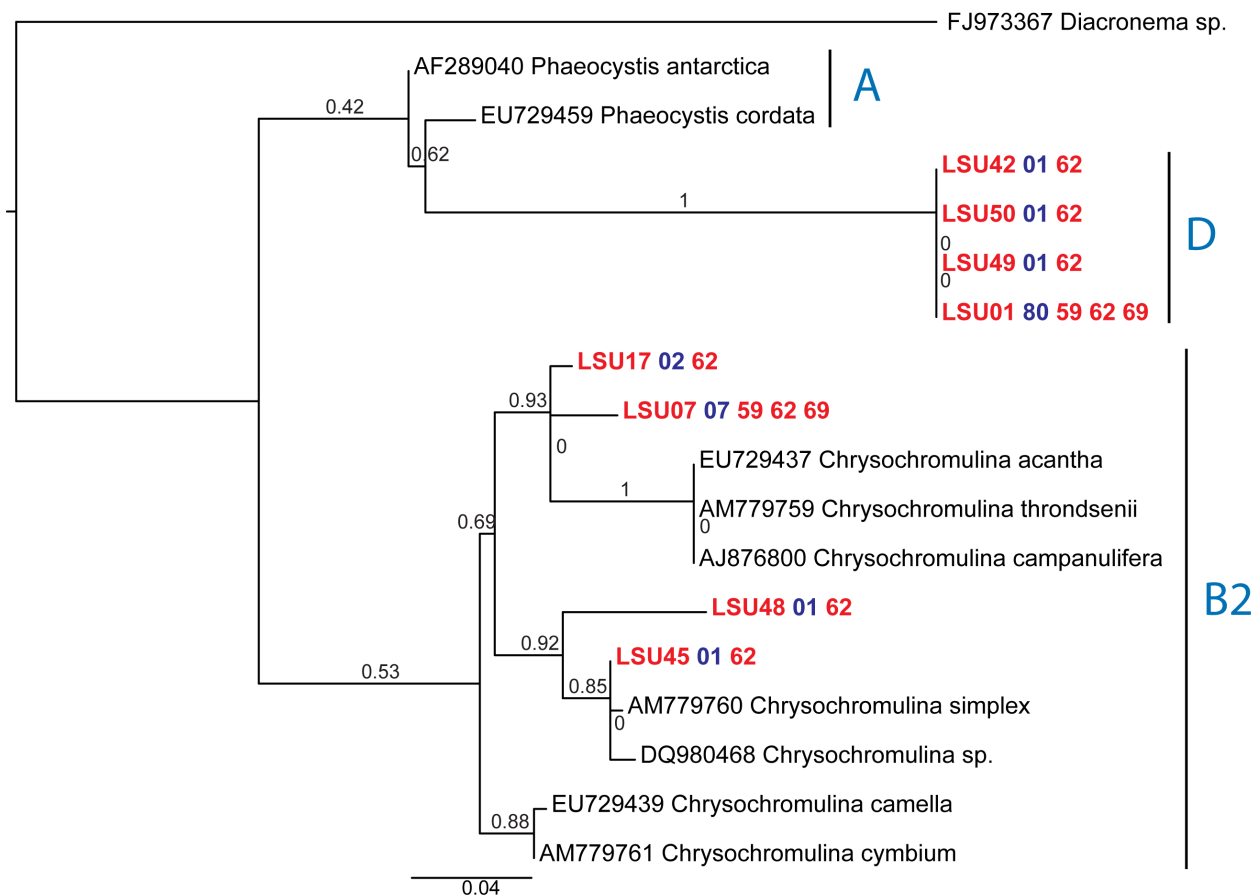
Figur 3.13: Haptophyta “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på LSU rDNA-OTU’er. A = Phaeocystis, B1-1 = Chrysocampanula, B1-2 = Imantonia, B1-4 = Haptolina, B1-5 = Prymnesium, B2 = Chrysochromulinaceae, C = Kokkolittoforider og D = Ubeskrevet gruppe. Se figur 3.9 for forklaring av navn på OTU’er.



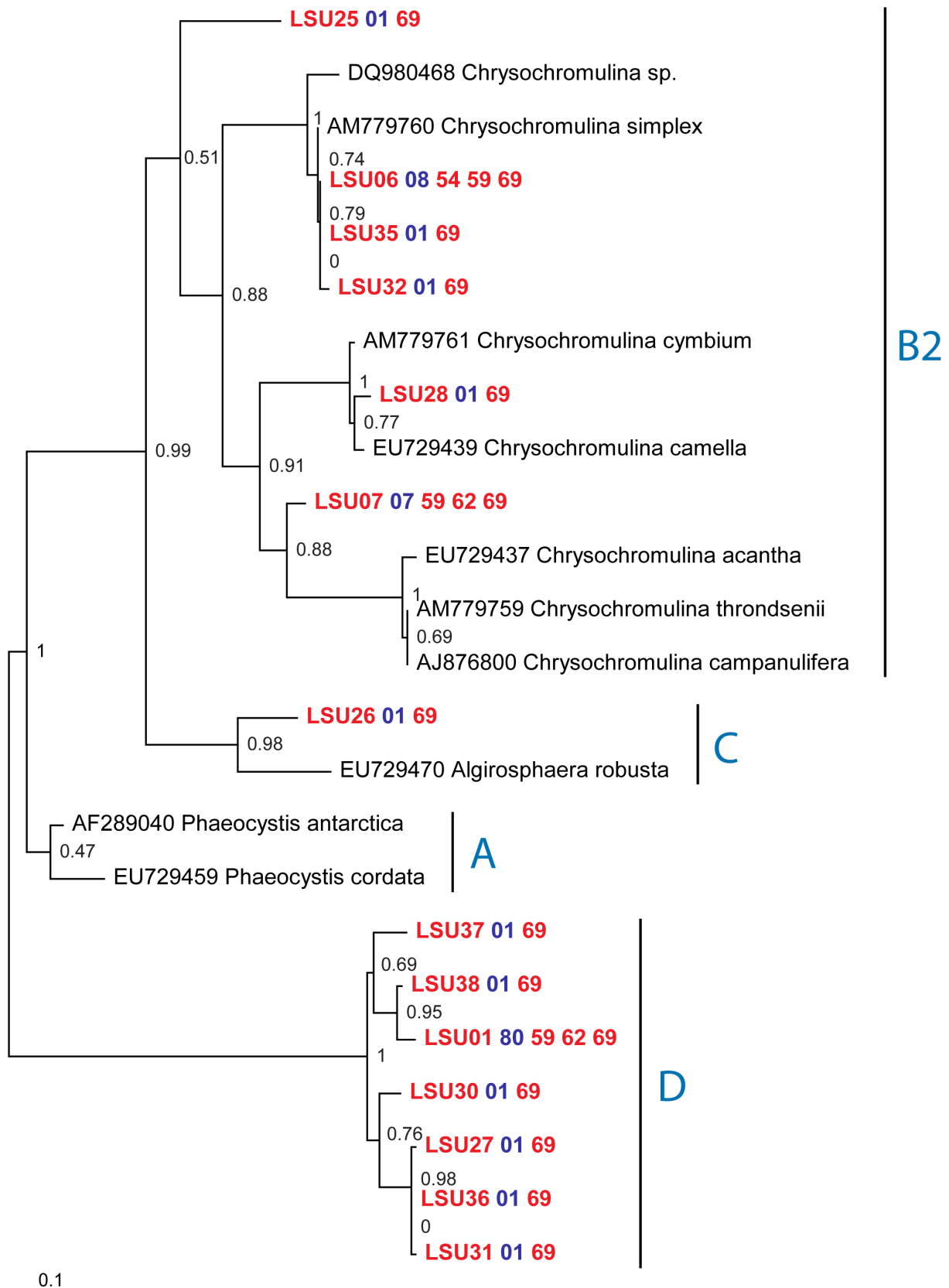
Figur 3.14: Haptophyta “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på LSU rDNA-OTU’er fra stasjon 54. B2 = Chrysochromulinaceae. Se figur 3.9 for forklaring av navn på OTU’er.



Figur 3.15: Haptophyta “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på LSU rDNA-OTU’er fra stasjon 59. A = *Phaeocystis*, B2 = *Chrysochromulinaceae* og D = Ubeskrevet gruppe. Se figur 3.9 for forklaring av navn på OTU’er.



Figur 3.16: Haptophyta “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på LSU rDNA-OTU’er fra stasjon 62. A = *Phaeocystis*, B2 = *Chrysochromulaceae* og D = Ubeskrevet gruppe. Se figur 3.9 for forklaring av navn på OTU’er.



Figur 3.17: Haptophyta “Maximum Likelihood” (ML)-tre basert på LSU rDNA-OTU’er fra stasjon 69. A = Phaeocystis, B2 = Chrysochromulinaceae, C = Kokkolittoforider og D = Ubeskrevet gruppe. Se figur 3.9 for forklaring av navn på OTU’er.

hverandre omkring estimert rikhet ved samme prøvestørrelse). For LSU rDNA varierer estimert rikhet fra 18,5 (stasjon 62) til 20 (stasjon 69), mens for SSU rDNA varierer estimert rikhet fra 9 (stasjon 62) til 11 (stasjon 54). Basert på rarefaction er det altså ingen stor forskjell i artsrikhet mellom undersøkelsens stasjoner. Det må nevnes at det her ikke er snakk om rikhet av alle arter, men rikhet av gruppene som er undersøkt. I SSU rDNA-tilfellet handler det om rikhet av protister, mens det i LSU rDNA-tilfellet handler om rikhet av svepeflagellater.

Tabell 3.4: Antall LSU rDNA-sekvenser, antall OTU'er og antall estimerte OTU'er etter rarefaction til minste prøvestørrelse.

Stasjon	Antall sekvenser	Antall OTU	Antall etter rarefaction
Stasjon 54	71	21	18,7
Stasjon 59	64	21	19,5
Stasjon 62	58	19	18,5
Stasjon 69	57	20	20,0

Tabell 3.5: Antall SSU rDNA-sekvenser, antall OTU'er og antall estimerte OTU'er etter rarefaction til minste prøvestørrelse.

Stasjon	Antall sekvenser	Antall OTU	Antall etter rarefaction
Stasjon 54	20	11	11,0
Stasjon 59	46	15	9,7
Stasjon 62	61	21	9,0
Stasjon 69	55	21	10,8

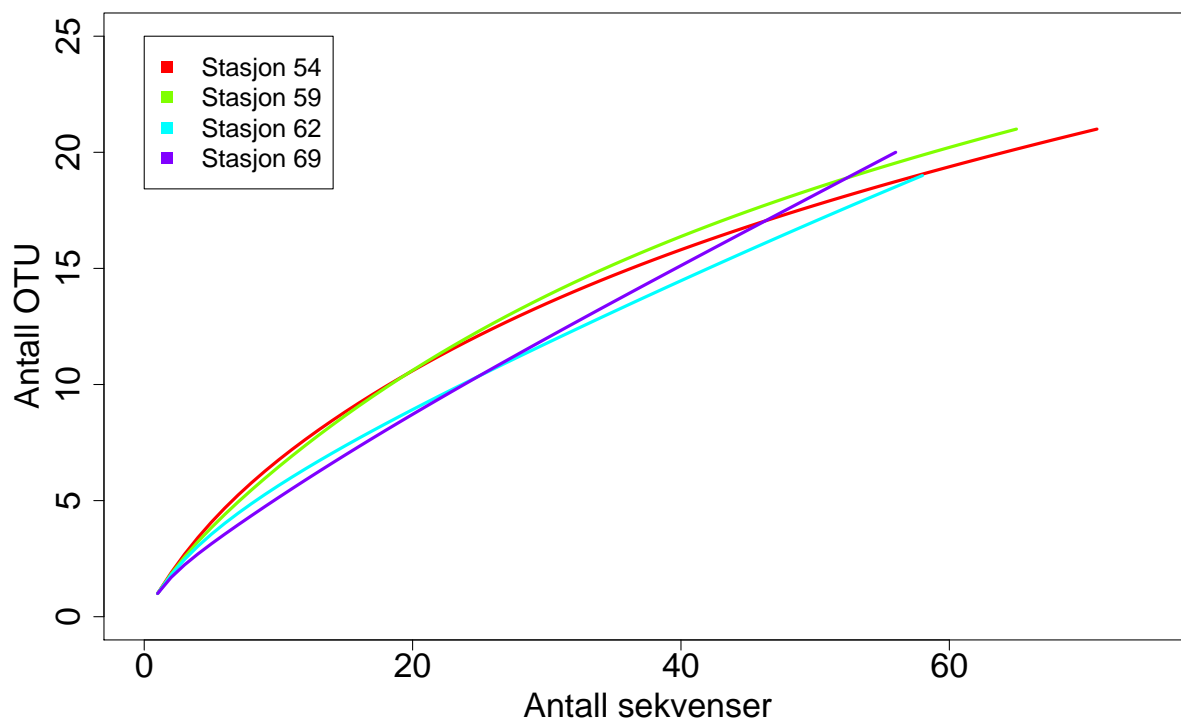
### 3.5.2 Geografisk avstand og taksonomisk avstand

#### 3.5.3 Likhet ( $\beta$ -diversitet)

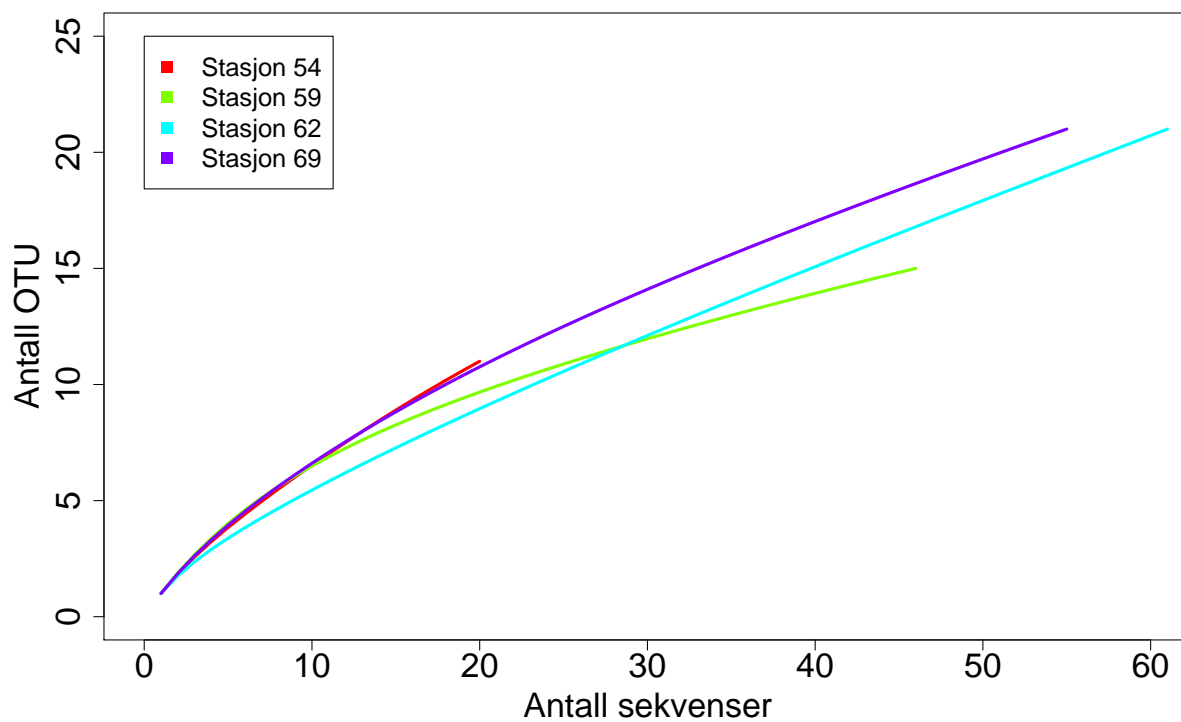
De fire stasjonene i denne studien ligger langsmed en rett linje fra nord til sør. Det er derfor ikke like langt mellom alle stasjonene. For å undersøke om det er store forskjeller mellom stasjonene, og om det er noen sammenheng mellom geografisk avstand og forskjell i artssammensetning, kan man benytte seg av distansemål (likhetsmål, altså distanse i artssammensetning). I dette tilfellet er det Simpsons likhetsindeks som har blitt benyttet. En eventuell forskjell behøver ikke skyldes fysisk avstand, det er derfor nødvendig å se eventuelle forskjeller i lys av alle mulige forklaringsvariable. Siden mine prøver er blandeprøver fra flere dyp vil det ikke være mulig å undersøke effekten av miljøvariable på artssammensetning (bortsett fra temperatur er det stor variasjon med dyp for flere av miljøvariablene), og jeg har derfor holdt meg til breddegrad som eneste forklaringsvariabel. Dersom en annen miljøvariabel (f.eks. temperatur) er korrelert med breddegrad vil man ikke kunne si hva som er årsaken til variasjonen (temperatur eller breddegrad i dette tilfellet), men man kan likevel avdekke variasjonen.

Ren likhet mellom alle stasjonspar (basert på Simpsons likhetsindeks) kan sees i tabell 3.6. Den oppgir likheten mellom to stasjoner på en skala fra 0 (ingen likhet) til 1 (helt like). Det

(a)



(b)



Figur 3.18: Rarefaction-kurver for de fire stasjonene basert på antall OTU'er blandt LSU rDNA-sekvenser (a) og SSU rDNA-sekvenser (b).



er her tydelig at stasjon 54 er meget forskjellig fra de tre andre stasjonene. I LSU rDNA-tilfellet ligner stasjon 59 mer på stasjon 62 enn den ligner på stasjon 69, dette er i tråd med en sammenheng mellom geografisk og taksonomisk avstand. I SSU rDNA-tilfellet ligner stasjon 59 mer på stasjon 69 enn den ligner på stasjon 62, dette er altså ikke i tråd med en sammenheng mellom geografisk avstand og taksonomisk avstand.

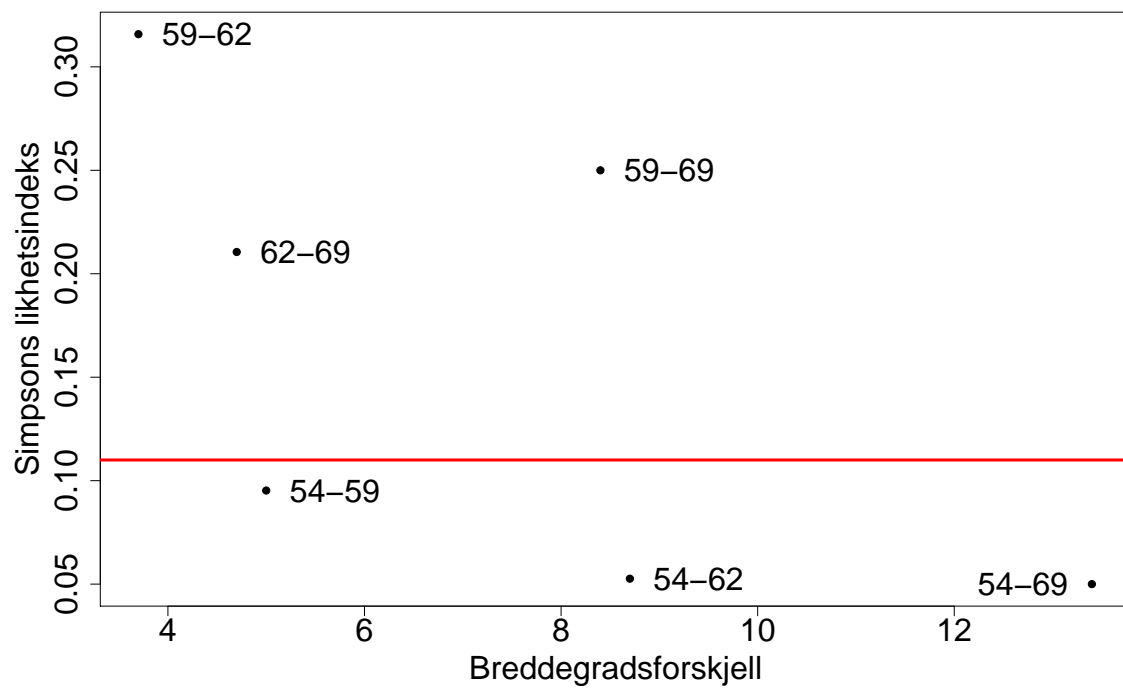
Dette er undersøkt videre i figur 3.19a og 3.19b, hvor forskjell mellom to stasjoner er plottet mot geografisk avstand. Det er ingen signifikant korrelasjon i noen av tilfellene ( $p = 0,18$  for LSU rDNA og  $p = 0,41$  for SSU rDNA), dette skyldes at stasjon 54 og 59 er mer forskjellig enn forventet dersom nærliggende stasjoner skal være like, og at stasjon 59 og 69 er likere enn forventet. Det er tydelig ut fra de to figurene at stasjon 54 er meget forskjellig fra samtlige av de andre stasjonene, uansett hvor nærme de ligger.

Jeg har også foretatt en GNMDS-analyse i én dimensjon (GNMDS = “Global Non-metric Multidimensional Scaling”). Denne analysen i én dimensjon forsøker å forklare mest mulig av variasjonen i artssammensetning ved hjelp av én akse. Med andre ord; jo lenger fra hverandre to stasjoner havner på en GNMDS-akse, jo større er forskjellen i artssammensetning mellom dem. I LSU rDNA-tilfellet gjengis geografisk forskjell i ganske stor grad (figur 3.20a), mens det i SSU rDNA-tilfellet (figur 3.20b) blir en forandring. Stasjon 69 blir plassert mellom stasjon 54 og 62, istedet for etter stasjon 69. Dette stemmer med observasjonene basert på simpsonlikhet.

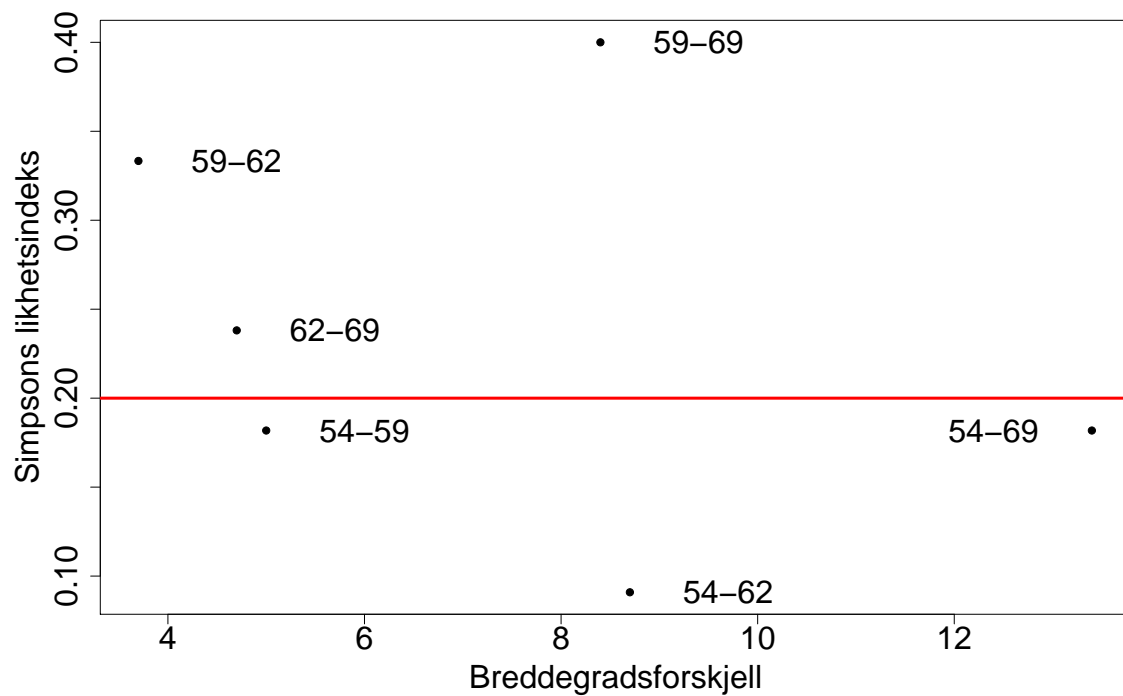
Tabell 3.6: Simpsonlikhet mellom alle par av stasjoner basert på både LSU og SSU rDNA-sekvenser.

Stasjon 1	Stasjon 2	Simpsons indeks	
		LSU	SSU
54	59	0,10	0,18
54	62	0,05	0,09
54	69	0,05	0,18
59	62	0,32	0,33
59	69	0,25	0,40
62	69	0,21	0,24

(a)

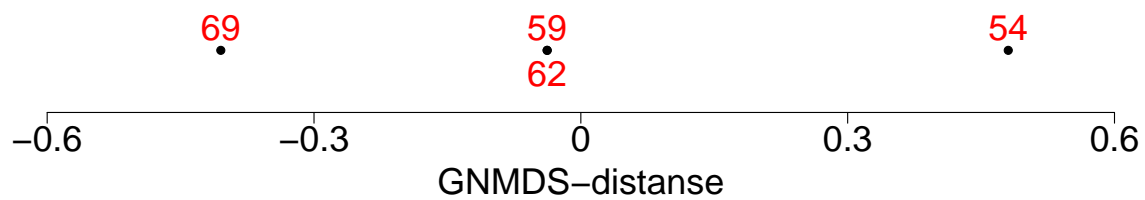


(b)

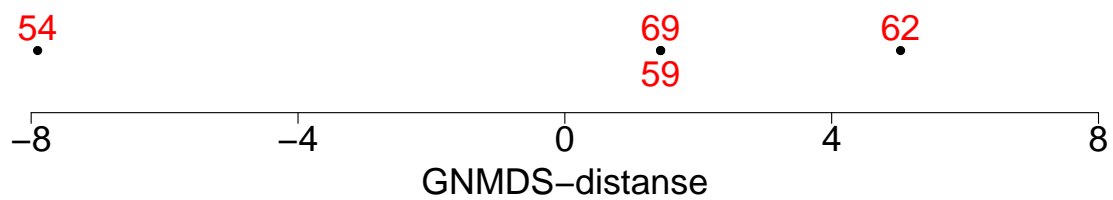


Figur 3.19: Simpsonlikhet plottet mot avstand i breddegrader for alle par av stasjoner basert på LSU rDNA-sekvenser (a), og SSU rDNA-sekvenser (b). Den røde linjen er tilstede for å illustrere at stasjon 54 er meget forskjellig fra de andre stasjonene.

(a)



(b)



Figur 3.20: Relativ taksonomisk avstand fra en GNMDS-analyse av LSU rDNA-data (a) og SSU rDNA-data (b) mellom de fire stasjonene.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Hydrografiske forhold

#### 4.1.1 Fysiske parametre

CTD-grafen for stasjon 54 viser en situasjon som ikke er stabil med dypet. CTD-grafene for stasjon 59, 62 og 69 viser derimot et øvre blandingslag ned til  $\sim 100 - 150$  m utelukkende bestemt av salinitet, med ett svakt klorofyllmaksimum ved  $\sim 50 - 75$  m. Siden sjøisen ikke har vært nær nok til å kunne påvirke overflatelaget (over 250 km unna, som beskrevet i innledningen), må dette mindre salte overflatelaget skyldes noe annet enn vår/sommer-smelting av sjøis. Årsaken er høyst sannsynlig nedbør, siden dette området befinner seg i en konvergenssone mellom to atmosfæriske celler og er preget av relativt store nedbørsmengder (Stewart, 1997). Siden disse stasjonene har et tilsynelatende stabilt overflatelag er det naturlig at klorofyllmaksimaene befinner seg der de gjør; overflatelaget hindrer utsynking av planteplankton. Det er likevel viktig å legge merke til at mange av verdiene varierer veldig lite med dypet (spesielt salinitet, temperatur og tetthet), og at det som på figurene ser ut som stabile overflatelag og tydelige klorofyllmaksima kanskje ikke er så definerte i virkeligheten.

#### 4.1.2 Kjemiske parametre

Figurene som viser fordeling av fosfat, nitrogen og silikat oppfører seg som forventet. I området nord for polarfronten er jern tilgjengelig, og det er makronæringssaltene som blir begrensende faktor. I dette området er fosfat, silikat og nitrogen tilstede i lave verdier. Bracher et al. (1999) fant konsentrasjoner omkring 80, 18 og  $1,3 \mu\text{M}$  for henholdsvis silikat, nitrat og fosfat sør for polarfronten, og silikatverdier så lave som  $0,41 \mu\text{M}$  nord for polarfronten. Dette er omtrent de samme verdiene som opptrer i mine data, men med en noe større differanse mellom de største og minste silikatverdiene. Nitritt har et såpass lite bidrag at det ikke blir problematisk å sammenligne nitrat med nitrat+nitritt. Alle disse verdiene er langt over et begrensende nivå for planteplanktonvekst, sannsynligvis grunnet jernbegrensning.

Tidligere undersøkelser fant klorofyllverdier under  $0,8 \mu\text{g chl } a \cdot \text{L}^{-1}$  (Bracher et al., 1999) og  $0,25 \mu\text{g chl } a \cdot \text{L}^{-1}$  (Treguer og Jacques, 1992) i permanent åpent hav-sonen, og under  $1,8 \mu\text{g chl } a \cdot \text{L}^{-1}$  (Bracher et al., 1999) i polarfrontsonen. I min *in vitro* fluorescens-figur, er verdiene under  $0,15 \mu\text{g chl } a \cdot \text{L}^{-1}$  og  $0,2 \mu\text{g chl } a \cdot \text{L}^{-1}$  i henholdsvis permanent åpent hav-sonen og polarfrontsonen, men med en dobling av permanent åpent hav-verdiene i et område rundt stasjon 62 (og delvis 59), noe som indikerer en svak økning i klorofyll i dette området. Salinitetsverdiene ved denne stasjonen er noe høyere enn ved de nærliggende stasjonene, noe som kan bety at en annen vannmasse har påvirket dette området med en tilførsel av jern som tillater planteplanktonvekst. Det er også en økning i klorofyllverdier sør for  $65^\circ\text{S}$ , nærmere kontinentet,

som sannsynligvis skyldes oppvelling med tilførsel av næringssalter og sporstoffer fra dypet, noe som støttes av konturplottene for næringssalter.

## 4.2 Taksonomisk fordeling

### 4.2.1 SSU ribosomalt DNA

Seksten (89 %) av svepeflagellatsekvensene havnet sammen med sekvenser av *Phaeocystis* spp. (figur 3.9), med mest likhet til *Phaeocystis antarctica*, en art som er utbredt i Antarktis, både i den marginale issonen og i åpent hav (Marchant og Thomsen, 1994; Medlin et al., 2004; Scott et al., 2005). Én sekvens (SSU48) havnet i B2-gruppen (Chrysochromulinaceae), en gruppe med mange ubeskrevne arter som jeg går grundigere gjennom i diskusjonen av LSU rDNA-sekvenser, og én sekvens (SSU53) havnet i D-gruppen (ubeskrevet søstergruppe av *Phaeocystis*), de uidentifiserte referansesekvensene jeg benyttet i denne gruppen er fra Stillehavet, fra Moonvan Der Staay et al. (2000), hvor det er tydelig at de tilhører en søstergruppe av *Phaeocystis*, altså D-gruppen.

Blandt sekvensene som tilfaller Stramenopila (figur 3.10) ligner de fleste av mine OTU'er på kjente sekvenser. Et viktig unntak er gruppen som inneholder SSU02, SSU20 og SSU26. AY485478 *Minutocellus polymorphus* og en ukjent eukaryot (AB191429) er sekvensene som dukker opp som de sekvensene som ligner mest i BLAST, men i "Maximum Likelihood"-treet plasseres de ikke sammen med mine sekvenser. Det er derimot *Chaetoceros* spp. som plasseres nærmest i treet. Mine sekvenser representerer sannsynligvis arter som enten ikke er sekvensert eller ikke oppdaget. Det er lite som tyder på at de alle er kimærer, spesielt SSU02 som representerer 16 sekvenser fra tre forskjellige stasjoner. Dersom SSU02 er en kimær må den samme kimæren ha oppstått i tre uavhengige PCR-reaksjoner, noe som er lite sannsynlig. Av de sekvensene som deler stor likhet med enkelte av OTU'ene mine (spesielt *Actinocyclus curvatulus* med SSU49, *Fragilariopsis cylindrus* med SSU06 og *Cylindrotheca closterium* med SSU34) er alle kjente arter fra Antarktis (Scott et al., 2005).

Det er ingen av dinoflagellatsekvensene som viser 100 % likhet med kjente dinoflagellatarter (se figur 3.11). Det er dog flere av SSU rDNA-sekvensene som har stor likhet til sekvenser med navnet "*Dinophyceae* sp.". Dette er spesielt interessant for sekvensen SSU01 som representerer hele 68 sekvenser. Sekvensen som plasseres nærmest SSU01 er "*Dinophyceae* sp. CCMP1878" (aksesjonsnummer AY251287), en sekvens man ikke vet noe konkret om (Seaborn et al., 2006). Dette er sannsynligvis en art som ikke er vanskelig å få opp med molekylære metoder i dette området, og som utvilsomt vil være interessant å få i kultur for bestemmelse. Sekvensene SSU17, SSU21 og SSU50 får alle lange grener, noe som kan kjennetegne kimærer (Liu et al., 2009), men sekvenssammenstillingen viser ingen tegn til at disse sekvensene er kimærer (med mindre de er kimærer av nært beslektede arter, noe som gjør dem vanskelige å oppdage). Det finnes sekvenser som ligner på disse tre sekvensene, noe som kan tyde på at de ikke er kimærer, med mindre databasesekvensene også er kimærer, et problem som det er ytret bekymring for i flere tilfeller (bl.a. Gribaldo, 2002; Hugenholtz, 2003). De lange grenene kan også være et resultat av "Long Branch Attraction" (Gribaldo, 2002), et fenomen som skyldes at evolusjonshastigheten ikke er den samme i rDNA'et til alle organismer. To sekvenser fra arter med høy evolusjonsrate tiltrekker hverandre siden de begge er så ulike alle andre sekvenser, og havner derfor sammen i et fylogenetisk tre.

## 4.2.2 LSU ribosomalt DNA

Av 182 SSU rDNA-sekvenser var det kun 18 sekvenser som tilfalt Haptophyta (se tabell 3.2). Dette skyldes muligens svepeflagellatenes GC-rike DNA (en større andel av deres baser er G og C i forhold til hva som er tilfelle hos andre protister), en egenskap som gjør det vanskeligere for generelle primere å binde seg (Liu et al., 2009). I tillegg er det en base i primeren 1528R, som jeg har brukt i undersøkelsene av SSU rDNA, som ikke passer med målområdet i svepeflagellatenes DNA. Fraværet av svepeflagellatsekvenser kan også skyldes at svepeflagellater har færre kopier av rDNA operonet enn hva som er tilfelle for dinoflagellater og kiselalger (Zhu et al., 2005).

SSU rDNA-undersøkelser med generelle primere er altså ikke metoden som bør benyttes for å avdekke kunnskap om svepeflagellater. Moon-van Der Staay et al. 2000 brukte modifiserte versjoner av generelle primere (for å fjerne problemet nevnt over), fulgt av prober for å fokusere på svepeflagellater. Et annet alternativ er å bruke spesifikke primere direkte. Liu et al. (2009) utviklet spesifikke primere for denne hensikten, for LSU rDNA. Disse primerne førte til at alt annet enn svepeflagellatsekvenser ble ekskludert fra miljøprøvene til Liu et al. (2009). I mitt tilfelle var det hele 66 av 250 sekvenser (26,4 %) som *ikke* tilhørte Haptophyta (se tabell 3.3). Hvorfor det var en slik forskjell mellom Liu et al. (2009) og min undersøkelse er vanskelig å si. Det kan skyldes at polymerase-enzymet jeg benyttet ikke var det samme som i Liu et al. (2009), noe som også førte til at PCR-programmet mitt var annerledes (polymerase-enzymet har forskjellige optimale temperaturer).

Når det gjelder den fylogenetiske plasseringen av mine LSU rDNA-sekvenser (se figur 3.13) er det spesielt tre ting som er verdt å merke seg: (i) det var *ingen* sekvenser som havnet i A-gruppen (*Phaeocystis*), gruppen hvor nesten alle SSU rDNA-sekvenser fra svepeflagellater havnet, (ii) en stor andel av sekvensene (36,4 %) havnet i D-gruppen (ubeskrevet søstergruppe av *Phaeocystis*), og (iii) mange sekvenser (92, 36,8 %) havnet i B2-gruppen (*Chrysochromulinaceae*) uten å nødvendigvis ligne på kjente arter fra denne gruppen.

Hva som er grunnen til (i) er uklart. Den svepeflagellat spesifikk primeren (Hapto4F) passer ikke perfekt med alle svepeflagellater (det er blandt annet fire baseforskjeller for FJ973367 *Diacronema* sp., AM850702 *Pavlova gyra*ns og andre i klassen Pavlovophyceae), men det viser seg at Hapto4F passer 100 % med *Phaeocystis antarctica*. Én av de atten SSU rDNA-sekvensene havner riktignok i D-gruppen, men hvorfor det er en slik forskyvning i favør av A-gruppen i SSU rDNA-tilfellet er vanskelig å si. Det er også mange sekvenser som havnet i gruppe D (ii), totalt 91 sekvenser havnet i denne gruppen, et antall av størrelsen man skulle forvente i gruppe A etter å ha sett SSU rDNA-resultatene. Det siste punktet nevnt over, (iii), er ikke noen stor overraskelse. Moon-van Der Staay et al. (2000), Liu et al. (2009) og McDonald et al. (2007) fant også mange ukjente sekvenser i denne gruppen, mine resultater tyder på at det finnes ukjente sekvenser også i Sørishavet (et område som ikke er undersøkt i de nevnte artiklene). Selv om sekvensene er ukjente betyr dette ikke nødvendigvis at det finnes mange helt uoppdagede arter, Scott et al. (2005) viser til hele 13 forskjellige ubeskrevne *Chrysochromulina*-typer basert på morfologi (blandt annet skjellstruktur).

I tillegg til stor variasjon blandt LSU rDNA-sekvensene er det også variasjon mellom undersøkelsens fire stasjoner. Som jeg kommer tilbake til senere ser de fire stasjonene ut til å utgjøre to grupper; gruppe 1 med stasjon 54 og gruppe 2 med de tre andre stasjonene, i stedet for en gradient bestemt av breddegrad med én gruppe per stasjon. OTU'ene ved stasjon 54 havner kun innenfor B2-gruppen, mens OTU'ene ved de tre andre stasjonene havner i D-gruppen i tillegg. Dersom D-gruppen på noe vis forholder seg til A-gruppen (*Phaeocystis*) er ikke dette så overraskende siden Sørishavet er sterkt preget av *Phaeocystis antarctica*, mens stasjon 54, som ligger nord for polarfronten, ikke har en eneste representant fra hverken A- eller D-gruppen.

## 4.3 Diversitet

Det største problemet som melder seg når det gjelder undersøkelser av rikhet og likhet basert på DNA-sekvenser, er at én sekvens høyst sannsynlig ikke er synonymt med ett individ. Dersom man har en prøve som består av like mange individer av artene *Nannochloropsis salina* og *Akashiwo sanguinea*, vil man forvente å finne 12.000 ganger så mange genkopier av sistnevnte i forhold til førstnevnte (som nevnt i innledningen). Dette er forbeholdt at PCR-reaksjonen ender opp med det samme forholdet som prøven hadde i utgangspunktet, noe man ikke nødvendigvis kan anta.

En PCR-reaksjons oppformering følger en eksponensiell vekst av formen  $2^n$ , det vil si at antallet sekvenser dobles for hver syklus. Dersom ingen av de få sekvensene som tilhører *Nannochloropsis salina* i eksempelet over blir oppformert i første syklus, vil sjansen for at de blir fanget opp i andre syklus bli betydelig redusert. Det er likevel påvist for et spesifikt primerpar at forholdet mellom to templatet i sluttproduktet blir 1:1 uansett opprinnelig forhold, som nevnt tidligere. Dette skjer fordi templatet med høyest opprinnelig konsentrasjon når en metning, mens det andre templatet vil fortsette å la seg oppformere. I dette tilfellet ble dette testet for to templatet, men det kan meget vel hende at dette også er tilfelle for flere templatet, og med andre primerpar enn det som ble benyttet.

Kloning gir i teorien anledning til å oppdage alle sekvenser i et PCR-produkt, og så lenge sekvenser fra en stor andel av individene i den originale vannprøven blir oppformert, vil man ha anledning til å oppdage de fleste av dem ved hjelp av kloning. Det er allerede åpenbart at antall like kloner ikke er proporsjonalt med antall individer (men antall like sekvenser, som fint kan stamme fra samme individ). Derfor vil metoder som forholder seg til relativ abundans bli problematiske, men hvis metodene lar oss oppdage mesteparten av artene som var tilstede i den opprinnelige prøven, kan tilstede/ikke-tilstede metoder gi tilfredsstillende resultater.

Det finnes også flere mulige feilkilder på veien til isolert DNA; den lille vannmassen prøven blir hentet fra behøver ikke være representativ for området (flekkvis fordeling [“patchiness”] er vanlig hos planteplankton [Martin, 2003], og kjent også fra Sørishavet [Boyd, 2002]), filterstørrelse påvirker hvilke celler som blir samlet opp, i tillegg vil ødelagte celler kunne forsvinne gjennom filtrene, og ikke alle arters DNA lar seg isolere like lett. Disse faktorene vil kunne føre til at flere arter som hører til i vannmassen mangler i den endelige prøven.

Man må altså ta for gitt at det man ender opp med ikke er et totalt representativt bilde av hva som faktisk lever i havområdet som undersøkes, men det betyr ikke at prøvene ikke kan sammenlignes. Dersom man tar alle prøver etter samme protokoll, og behandler dem på akkurat samme måte, vil en sammenligning kunne gi mening. De artene som lett lar seg observere i en analyse vil dukke opp på alle lokaliteter hvor de er tilstede, og det motsatte vil være tilfelle for sjeldne arter som er vanskelige å få tak i. Søylediagrammene (figur 3.8 og 3.12) viser definitive forskjeller mellom de fire stasjonene, og de viktigste forskjellene her er representert med mange sekvenser. Det vil derfor være rimelig å anta at disse stasjonene er ulike når det gjelder artssammensetning. For å kunne undersøke dette på et objektivt vis må man anvende en form for likhetsmål. Det vil som nevnt ikke gi mening å benytte noen mål som avhenger av relative mengder av individer, men tilstede/ikke-tilstede-metoder vil kunne gi et akseptabelt mål på likhet. Simpsonindeksen som jeg har benyttet i denne oppgaven er et eksempel på en slik metode, og alle mine analyser som baserer seg på likhet benytter denne metoden.

I figur 3.19 (seksjon 3.5.3) har jeg undersøkt om likhet basert på simpsonindeksen er korrelert med geografisk avstand (breddegradsforskjell). Det viser seg at det ikke er noen signifikant korrelasjon hverken for SSU rDNA eller LSU rDNA. Det ser ut som at de fire stasjonene kan sees på som to grupper, i stedet for en geografisk gradient med fire grupper (stasjoner), hvor

stasjon 54 nord for polarfronten utgjør den ene gruppen, mens de tre andre stasjonene (59, 62 og 69) utgjør den andre gruppen. Tabell 3.6 (seksjon 3.5.3) viser at stasjon 54 er veldig forskjellig fra de tre andre stasjonene (likheter  $< 0,10$  for LSU rDNA og  $< 0,18$  for SSU rDNA), mens de tre andre stasjonene ligner på hverandre uavhengig av geografisk posisjon (likheter  $0,21-0,32$  for LSU rDNA og  $0,24-0,40$  for SSU rDNA). Spesielt ligner stasjon 59 mer på stasjon 69 enn 62 for SSU rDNA, selv om stasjon 62 ligger nærmere geografisk. Dette viser seg også i GNMDS-analysen hvor stasjonene blir geografisk sortert basert på LSU rDNA-sekvenser, men ikke for SSU rDNA-sekvenser. Det er uansett slik at forskjellen mellom stasjon 54 og resten av stasjonene er veldig stor i forhold til forskjellene mellom de tre sørligste stasjonene (59, 62 og 69).

Det må nevnes at stasjon 54 kun er representert med 20 SSU rDNA-sekvenser grunnet problemer under kloning, noe som betyr at likhetene som involverer denne stasjonen ikke blir representative for de faktiske likhetene. Denne stasjonen ville enten ha lignet mer på de andre stasjonene dersom flere sekvenser ville avslørt arter som også er funnet på de andre stasjonene, eller ha lignet mindre dersom flere sekvenser ville avslørt sekvenser unike for denne stasjonen. Det siste er det mest sannsynlige hvis man sammenligner med LSU rDNA-tilfellet, hvor det samme mønsteret opptrer (med 54 signifikant forskjellig fra de tre andre stasjonene).

Som nevnt tidligere kan man skille mellom ekstrapolering og interpolering når det gjelder sammenligning av stasjoner og estimering av artsrikhet. Ekstrapolering kan gjøres på flere måter, men i dette tilfellet ville det vært naturlig med to metoder; tilpasse en modell til en rarefaction-kurve for å estimere hva som ville ha skjedd dersom jeg hadde sekvensert flere kloner, og å benytte en ikke-parametrisk estimator for å estimere total artsrikhet ved en stasjon. Begge disse metodene vil være ytterst tvilsomme å benytte her, spesielt fordi begge baserer seg på relativ abundans av individer, noe det ikke finnes noe grunnlag for å si noe om, men også fordi mine prøvestørrelser er relativt små. Som nevnt i innledningen vil små prøvestørrelser kunne gi veldig forskjellige rarefaction-kurver, og da også veldig forskjellige estimater for artsrikhet. Jeg har derfor unngått ekstrapolering i denne oppgaven.

Interpolering forsøker ikke å si noe om hva vi ikke vet, men i rarefaction-analysene har jeg benyttet relativ abundans av sekvenser, noe jeg allerede har beskrevet som potensielt tvilsomt. Dersom man tolker disse analysene forsiktig vil de likevel kunne ha noe for seg. Det disse analysene prøver å si noe om er (i) har vi sekvensert nok kloner til å nærme oss metning? Og (ii) hvor mange unike sekvenser (OTU'er) ville vi ha oppdaget ved å sekvensere færre kloner?

For å undersøke (i) må man se om en rarefaction-kurve ser ut til å flate ut mot en asymptote, men dette er problematisk i tilfeller med små prøvestørrelser siden man da kan få veldig forskjellige kurver. Likevel indikerer mine rarefaction-kurver at jeg er langt fra noen metning, de fleste sekvensene ble ikke oppdaget flere ganger. Variant (ii) benyttes for å forsøke å standardisere prøvene man har. Uansett hvor mye man prøver vil man ofte ende opp med forskjellige prøvestørrelser ved forskjellige stasjoner, men ved å bruke den informasjonen man har tilgjengelig fra hver stasjon kan man forsøke å si noe om hvor mange unike sekvenser (OTU'er) man ville ha funnet dersom man hadde sekvensert *færre* kloner. Mine resultater gir ingen grunnlag for å anta at mine stasjoner har forskjellig artsrikhet, hverken basert på SSU rDNA eller LSU rDNA. Dersom et mye større antall kloner hadde blitt sekvensert ville man kanskje kunne ha sett en forskjell her, men det kan også hende at den virkelige artsrikheten ikke varierer mellom stasjonene mine.



## 4.4 Sammenheng mellom miljøvariable, klorofyll og arts-sammensetning

Det er høyere klorofyllverdier rundt stasjon 62 (og delvis 59) enn ved de andre stasjonene. Denne økningen kan ikke forklares av næringssaltverdier siden ingen av makronæringssaltene utgjør noen begrensning for algevekst sør for polarfronten. Som nevnt kan dette området være påvirket av en annen vannmasse (salinitetsverdiene er noe høyere i dette området enn i området rundt), en påvirkning som kan ha tilført sporstoffer som jern. Det er derfor en mulig forskjell mellom artssammensetningen ved stasjon 62 (og kanskje 59) og stasjon 69. Det er ingen tvil om at stasjon 54 skiller seg fra de tre andre stasjonene, og en eventuell forskjell mellom stasjon 54 og 62 vil neppe skyldes forskjellen i klorofyllverdier alene. Stasjon 54 er ikke begrenset av jern, men av makronæringssalter, noe som vil føre til et annet grunnlag for artssammensetningen ved denne stasjonen. Når det gjelder forskjeller mellom de tre sørlige stasjonene (59, 62 og 69), viser det seg for LSU rDNA-sekvenser at stasjon 62 og 59 deler en større likhet enn noen av disse to deler med stasjon 69. Dette skyldes kanskje de økte klorofyllverdiene (og spesielt årsaken for de økte klorofyllverdiene). Det samme gjelder ikke for SSU rDNA-sekvensene, hvor stasjon 62 skiller seg fra både stasjon 59 og 69. Dette kan likevel også ha en sammenheng med økningen i klorofyll siden det er ved stasjon 62 økningen er tydeligst.

Det er dessverre ikke nok grunnlag for å trekke noen konklusjoner ut av dette datamaterialet. Kanskje spesielt fordi området sør for polarfronten er så homogent når det gjelder næringssaltdata, dersom også jernverdier hadde vært tilgjengelig kunne man kanskje sagt noe mer. Det er også slik at antallet sekvenser fra hver stasjon er for lite å basere seg på, en grundigere undersøkelse (altså mye flere sekvenser, f.eks. ved 454-sekvensering) ville kanskje avslørt mer om forskjellene som indikeres av mine data. Kanskje er de større og kanskje er de ikke der i det hele tatt, de kan være et produkt av små prøvestørrelser.

## 4.5 OTU-nivåer

Avhengig av hvilken organismegruppe og hvilket gen som er blitt undersøkt, har mange forskjellige OTU-nivåer blitt benyttet tidligere (se Caron et al. 2009). Mange av disse nivåene er blitt benyttet uten noen form for testing, men heller basert på kjennskap til baseforskjeller hos godt sammenstilte sekvenser fra forskjellige arter. En forskjell som kan øke dersom de samme sekvensene ikke allerede er i en sekvenssammenstilling (Caron et al., 2009), noe som er tilfelle i grupperings ("clustering")-programmer. Det er også blitt foreslått egne OTU-nivåer for bestemte organismegrupper, men da med forbehold (Nebel et al., 2010).

Mine undersøkelser indikerer at det å bestemme generelle OTU-nivåer, selv for konkrete grupper, ikke har noen hensikt. Figur 3.6a og 3.6b viser stor variasjon mellom to programmer ved de samme OTU-nivåene. Det er riktignok ingen bemerkelsesverdig forskjell i treffsikkerhet for SSU rDNA-sekvenser, men grupperingene var likevel meget forskjellige. CLOTU presterte gjennomgående bedre ved realistiske OTU-nivåer, noe som understreker forskjellen som kan oppstå ved bruk av forskjellige algoritmer. Det er altså ikke nok å si at en sekvenslikhet på 99,3 % er ideell for LSU rDNA-sekvenser fra svepeflagellater, det forutsettes også at det er programmet CLOTU som benyttes. Det vil si at dersom det skal være noen hensikt i å bestemme standardiserte OTU-nivåer, må også standardiserte grupperings ("clustering")-programmer benyttes.

## 4.6 Oppsummering og konklusjoner

Hovedmålet med denne oppgaven, som formulert i innledningen, var å undersøke diversitet av nano- og pikoplankton ved hjelp av molekylærbiologiske metoder i den atlantiske delen av Sørishavet. I tillegg ønsket jeg å undersøke om numeriske diversitetsanalyser, med fokus på artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet) og likhet mellom lokaliteter ( $\beta$ -diversitet), kan benyttes på data fra molekylærbiologiske metoder. For å belyse disse målene ble flere problemstillinger presentert. Den første handlet om hvilke taksa av nano- og pikoplankton jeg ville finne i undersøkelsesområdet. Her fant jeg mange representanter fra den ubeskrevne D-gruppen i tillegg til stor variasjon i B2-gruppen blandt LSU rDNA-sekvensene. Den kanskje største overraskelsen i mine undersøkelser er dominansen av sekvenser fra D-gruppen for LSU rDNA i forhold til SSU rDNA, en forskjell jeg ikke har klart å forklare. I SSU rDNA-sekvensene var sekvensene kjent i større grad, med unntak av en kiselalgegruppe og flere av dinoflagellatsekvensene. Blandt dinoflagellatsekvensene var det spesielt én sekvens, SSU01, som dominerte tallmessig, men som ikke ligner noen kjent sekvens. Dersom sekvensens tallrikhet reflekterer artens tallrikhet ville morfologiske undersøkelser kunne ha oppdaget den. I tillegg til denne sekvensen var det mange andre dinoflagellatsekvenser som heller ikke har noen like sekvenser i databasene. Dette tyder på at det finnes mange usekvenserte, og kanskje også ukjente, dinoflagellatarter som er mindre enn  $35\ \mu\text{m}$  i dette området.

For å besvare denne problemstillingen er metodene benyttet i denne oppgaven tilfredsstillende, men i tillegg burde prøvene ha blitt undersøkt i elektronmikroskop for å i større grad undersøke hva de ukjente sekvensene representerer (prøver for EM finnes og vil undersøkes senere). De kan godt representere kjente arter som ikke er sekvensert enda. For fremtidige undersøkelser vil det være interessant å finne en forklaring på fordelingen av sekvenser i B2- og D-gruppen blandt svepeflagellatene, i tillegg til identiteten til dinoflagellatsekvensen SSU01 og den ukjente kiselalgegruppen (SSU02, SSU20 og SSU26).

Det er kjent at svepeflagellatslekten *Phaeocystis* spp. er en økologisk viktig art i Sørishavet, men denne slekten har en ukjent søstergruppe (D-gruppen), som basert på mine LSU rDNA-sekvenser ser ut til å være tallrik i Sørishavet. Hvis dette er tilfelle er det sannsynlig at også denne gruppen spiller en økologisk viktig rolle, og det vil være av stor interesse å samle mer kunnskap om denne gruppen.

En annen problemstilling handlet om artssammensetningen ved undersøkelsens fire stasjoner, og om den var lik langs hele transektet, både når det gjelder data fra LSU rDNA og SSU rDNA. Alle mine undersøkelser peker på at det er en tydelig forskjell mellom stasjon 54 (nord for polarfronten) og 59, 62 og 69 (sør for polarfronten), men det er ingen åpenbare tegn på at stasjon 59, 62 og 69 varierer seg i mellom. Selv om det var forskjeller mellom disse stasjonene var ingen av forskjellene tydelige nok til å trekke noen entydige konklusjoner. Det er spesielt i LSU rDNA-tilfellet at den store forskjellen er synlig, stasjon 54 består kun av sekvenser fra B2-gruppen, mens de tre andre stasjonene har mange sekvenser også fra D-gruppen.

De siste problemstillingene omhandlet diversitet- og artsrikhetsundersøkelser. Det er ingen tvil om at mulighetene for å undersøke artsrikhet ( $\alpha$ -diversitet) er begrensede med det materialet jeg har hatt tilgjengelig. Det eneste som kan være hensiktsmessig er rarefaction-undersøkelser som kan si noe om antallet unike sekvenser fra hver stasjon ved samme prøvestørrelse, en metode som kanskje kan si noe om hvilken stasjon som har høyest artsrikhet, men den kan ikke si noe om den *faktiske* artsrikheten ved en gitt stasjon. Det kan hende at mer omfattende metoder som 454-sekvensering kan belyse dette spørsmålet bedre, da man har mange flere sekvenser tilgjengelig og veldig få enkeltforekomster av sekvenser (artsrikhetsestimatører baserer seg gjerne på antall enkeltforekomster, siden en enkeltforekomst lett kunne ha vært

fraværende og det er derfor sannsynlig at det er flere arter som ikke er oppdaget).

Variasjon i diversitet, altså gradienter i artssammensetning ( $\beta$ -diversitet), kan i større grad undersøkes. Det er ingen tvil om at stasjon 54 skiller seg ut, og dette har metodene jeg har benyttet oppdaget. Grunnen til at jeg ikke fant noen entydig sammenheng mellom breddegrad og artssammensetning kan rett og slett være at det ikke er noen geografisk forskjell mellom de tre sørligste stasjonene. Dersom den sørligste stasjonen hadde vært en iskantstasjon ville kanskje denne stasjonens artssammensetning etablert en bedre geografisk sammenheng, gitt at den hadde hatt noe til felles med stasjonene mellom seg selv og stasjon 54. På samme måte som jeg benyttet breddegrad som forklaringsvariabel i denne oppgaven tror jeg andre forklaringsvariable vil kunne gi enda bedre resultater, men da må forsøket planlegges med dette som hensikt. Altså i et område med varierende miljøvariable. På samme måte som i artsrikhetstilfellet ville også disse metodene gitt sterkere resultater med flere stasjoner og et større tilgjengelig datamateriale, f.eks. fra 454-sekvensering.

Med ytterligere bruk og testing av likhets-metoder ( $\beta$ -diversitet) vil det kanskje være mulig å avdekke gradienter i artssammensetning i forskjellige havområder. Dersom dette blir gjort flere ganger over tid, vil man kunne overvåke endring av disse gradientene, noe som kan være en interessant indikator på endringer i lokale økosystemer.

For å oppsummere er det mye vi ikke vet om piko- og nanoplankton i den atlantiske delen av Sørishavet. Det finnes både morfologisk og molekylær kunnskap om mye av det som finnes der, men den molekylære kunnskapen må kobles til den morfologiske. Det jeg kan si ut fra mine resultater er at det er mye som enten er ubeskrevet eller ukjent, men for å virkelig ha glede av all den molekylære informasjonen må man få flere arter i kultur slik at sekvensene kan kobles til konkrete arter.

## APPENDIX A

# OTU-detalljer

## A.1 Gruppering av SSU rDNA-OTU'er ved 99% likhet

### A.1.1 MESA

Tabell A.1: Oversikt over SSU rDNA grupperinger (OTU'er) fra dataprogrammet MESA ved 99 % sekvenslikhet. Suboptimale grupper er merket med grå bakgrunn.

OTU	Art/Sekvens
1	<i>A. actinochilus</i>
2	<i>A. anophagefferens 1</i>
	<i>A. anophagefferens 2</i>
	<i>A. anophagefferens 3</i>
3	<i>A. curvatulus</i>
4	<i>A. longum</i>
5	<i>A. semilunatum</i>
6	<i>A. spinosum</i>
7	<i>B. malleus</i>
8	<i>C. acantha</i>
	<i>C. trondsenii</i>
9	<i>C. closterium 1</i>
	<i>C. closterium 2</i>
	<i>C. closterium 3</i>
10	<i>C. inerme</i>
11	<i>C. pelagicum</i>
12	<i>C. rostratus</i>
13	<i>C. scutellum</i>
14	<i>D. brightwellii 1</i>
	<i>D. brightwellii 2</i>
15	<i>D. collinii</i>
	<i>S. sweeneyae</i>
	<i>S. trochoidea</i>
16	<i>D. grandis</i>
17	<i>F. curta</i>
	<i>F. cylindrus 1</i>
	<i>F. cylindrus 2</i>

tabellen fortsetter på neste side

**Tabell A.1 - fortsatt fra forrige side**

OTU	Art/Sekvens
	<i>F. sublineata</i>
18	<i>G. aureolum 1</i>
	<i>G. aureolum 2</i>
19	<i>G. aureolum 3</i>
	<i>K. brevis</i>
	<i>K. mikimotoi</i>
20	<i>G. cf. gutrula</i>
	<i>G. dominans</i>
21	<i>G. dorsalisulcum</i>
22	<i>G. flaccida</i>
23	<i>G. fusiforme</i>
	<i>G. spirale</i>
24	<i>G. helveticum</i>
25	<i>P. tyrrhenicum</i>
26	<i>G. rubrum 1</i>
	<i>G. rubrum 2</i>
27	<i>H. lwoffii</i>
28	<i>H. niei</i>
29	<i>H. rotundata 1</i>
	<i>H. rotundata 2</i>
30	<i>K. micrum</i>
31	<i>L. flabellata</i>
32	<i>L. juergensii 1</i>
	<i>L. juergensii 2</i>
33	<i>M. helysia</i>
34	<i>M. polymorphus</i>
35	<i>O. magnificus</i>
36	<i>P. antarctica 1</i>
	<i>P. antarctica 2</i>
37	<i>P. calceolata 1</i>
	<i>P. calceolata 2</i>
38	<i>P. micans</i>
	<i>P. rhathymum 1</i>
	<i>P. rhathymum 2</i>
39	<i>P. minimum</i>
40	<i>P. pseudodenticulata</i>
41	<i>G. inaequale</i>
	<i>P. umbonatum</i>
42	<i>S. biarmatum</i>
43	<i>S. subsalina</i>
	<i>T. cf. pulchellum</i>
44	<i>T. pelagica</i>
45	<i>T. subtilis 1</i>
	<i>T. subtilis 2</i>

### A.1.2 CLOTU

Tabell A.2: Oversikt over SSU rDNA grupperinger (OTU'er) fra dataprogrammet CLOTU ved 99 % sekvenslikhet. Suboptimale grupper er merket med grå bakgrunn.

OTU	Art/Sekvens
1	<i>F. cylindrus 1</i> <i>F. curta</i> <i>F. sublineata</i> <i>F. cylindrus 2</i>
2	<i>P. tyrrhenicum</i> <i>P. umbonatum</i> <i>G. inaequale</i>
3	<i>C. closterium 1</i> <i>C. closterium 2</i> <i>C. closterium 3</i>
4	<i>A. anophagefferens 1</i> <i>A. anophagefferens 2</i> <i>A. anophagefferens 3</i>
5	<i>T. subtilis 1</i> <i>T. subtilis 2</i>
6	<i>S. trochoidea</i> <i>S. sweeneyae</i>
7	<i>P. rhathymum 1</i> <i>P. rhathymum 2</i>
8	<i>P. antarctica 1</i> <i>P. antarctica 2</i>
9	<i>L. juergensii 1</i> <i>L. juergensii 2</i>
10	<i>K. mikimotoi</i> <i>K. brevis</i>
11	<i>H. rotundata 1</i> <i>H. rotundata 2</i>
12	<i>G. fusiforme</i> <i>G. spirale</i>
13	<i>G. dominans</i> <i>G. cf. gutrula</i>
14	<i>G. aureolum 1</i> <i>G. aureolum 2</i>
15	<i>D. brightwellii 1</i> <i>D. brightwellii 2</i>
16	<i>C. acantha</i> <i>C. trondsenii</i>
17	<i>G. rubrum 1</i> <i>G. rubrum 2</i>

tabellen fortsetter på neste side

**Tabell A.2 - fortsatt fra forrige side**

OTU	Art/Sekvens
18	<i>T. pelagica</i>
19	<i>T. cf. pulchellum</i>
20	<i>S. subsalina</i>
21	<i>S. biarmatum</i>
22	<i>P. pseudodenticulata</i>
23	<i>P. minimum</i>
24	<i>P. micans</i>
25	<i>P. calceolata 1</i>
26	<i>P. calceolata 2</i>
27	<i>O. magnificus</i>
28	<i>M. polymorphus</i>
29	<i>M. helysia</i>
30	<i>L. flabellata</i>
31	<i>K. micrum</i>
32	<i>H. niei</i>
33	<i>H. lwoffi</i>
34	<i>G. helveticum</i>
35	<i>G. flaccida</i>
36	<i>G. dorsalisulcum</i>
37	<i>G. aureolum 3</i>
38	<i>D. grandis</i>
39	<i>D. collinii</i>
40	<i>C. scutellum</i>
41	<i>C. rostratus</i>
42	<i>C. pelagicum</i>
43	<i>C. inerme</i>
44	<i>B. malleus</i>
45	<i>A. spinosum</i>
46	<i>A. semilunatum</i>
47	<i>A. longum</i>
48	<i>A. curvatulus</i>
49	<i>A. actinochilus</i>

## A.2 Stasjonsfordeling av OTU'er

### A.2.1 SSU rDNA

Tabell A.3: Fordeling av SSU rDNA-OTU'er på de fire stasjonene.

OTU	Stasjon 54	Stasjon 59	Stasjon 62	Stasjon 69	Totalt
SSU01	8	12	29	19	68

tabellen fortsetter på neste side

**Tabell A.3 - fortsatt fra forrige side**

OTU	Stasjon 54	Stasjon 59	Stasjon 62	Stasjon 69	Totalt
SSU02	0	2	9	5	16
SSU03	2	7	0	5	14
SSU04	0	6	3	3	12
SSU05	0	5	1	1	7
SSU06	0	0	1	5	6
SSU07	0	4	0	0	4
SSU08	0	0	3	0	3
SSU09	0	2	0	1	3
SSU10	0	0	0	2	2
SSU11	0	0	0	2	2
SSU12	0	1	1	0	2
SSU13	2	0	0	0	2
SSU14	0	0	0	1	1
SSU15	0	0	0	1	1
SSU16	0	0	0	1	1
SSU17	0	0	0	1	1
SSU18	0	0	0	1	1
SSU19	0	0	0	1	1
SSU20	0	0	0	1	1
SSU21	0	0	0	1	1
SSU22	0	0	0	1	1
SSU23	0	0	0	1	1
SSU24	0	0	0	1	1
SSU25	0	0	0	1	1
SSU26	0	0	1	0	1
SSU27	0	0	1	0	1
SSU28	0	0	1	0	1
SSU29	0	0	1	0	1
SSU30	0	0	1	0	1
SSU31	0	0	1	0	1
SSU32	0	0	1	0	1
SSU33	0	0	1	0	1
SSU34	0	0	1	0	1
SSU35	0	0	1	0	1
SSU36	0	0	1	0	1
SSU37	0	0	1	0	1
SSU38	0	0	1	0	1
SSU39	0	0	1	0	1
SSU40	0	1	0	0	1
SSU41	0	1	0	0	1
SSU42	0	1	0	0	1
SSU43	0	1	0	0	1
SSU44	0	1	0	0	1
SSU45	0	1	0	0	1
SSU46	0	1	0	0	1

tabellen fortsetter på neste side



**Tabell A.3 - fortsatt fra forrige side**

OTU	Stasjon 54	Stasjon 59	Stasjon 62	Stasjon 69	Totalt
SSU47	1	0	0	0	1
SSU48	1	0	0	0	1
SSU49	1	0	0	0	1
SSU50	1	0	0	0	1
SSU51	1	0	0	0	1
SSU52	1	0	0	0	1
SSU53	1	0	0	0	1
SSU54	1	0	0	0	1

### A.2.2 LSU rDNA

Tabell A.4: Fordeling av LSU rDNA-OTU'er på de fire stasjonene.

OTU	Stasjon 54	Stasjon 59	Stasjon 62	Stasjon 69	Totalt
LSU01	0	25	24	31	80
LSU02	16	0	0	0	16
LSU03	16	0	0	0	16
LSU04	0	2	9	3	14
LSU05	0	4	7	1	12
LSU06	4	3	0	1	8
LSU07	0	4	1	2	7
LSU08	1	3	2	0	6
LSU09	0	0	0	5	5
LSU10	5	0	0	0	5
LSU11	0	4	0	0	4
LSU12	4	0	0	0	4
LSU13	4	0	0	0	4
LSU14	0	3	0	0	3
LSU15	3	0	0	0	3
LSU16	3	0	0	0	3
LSU17	0	0	2	0	2
LSU18	0	2	0	0	2
LSU19	0	2	0	0	2
LSU20	0	2	0	0	2
LSU21	0	1	1	0	2
LSU22	2	0	0	0	2
LSU23	2	0	0	0	2
LSU24	2	0	0	0	2
LSU25	0	0	0	1	1
LSU26	0	0	0	1	1
LSU27	0	0	0	1	1
LSU28	0	0	0	1	1

tabellen fortsetter på neste side

**Tabell A.4 - fortsatt fra forrige side**

OTU	Stasjon 54	Stasjon 59	Stasjon 62	Stasjon 69	Totalt
LSU29	0	0	0	1	1
LSU30	0	0	0	1	1
LSU31	0	0	0	1	1
LSU32	0	0	0	1	1
LSU33	0	0	0	1	1
LSU34	0	0	0	1	1
LSU35	0	0	0	1	1
LSU36	0	0	0	1	1
LSU37	0	0	0	1	1
LSU38	0	0	0	1	1
LSU39	0	0	1	0	1
LSU40	0	0	1	0	1
LSU41	0	0	1	0	1
LSU42	0	0	1	0	1
LSU43	0	0	1	0	1
LSU44	0	0	1	0	1
LSU45	0	0	1	0	1
LSU46	0	0	1	0	1
LSU47	0	0	1	0	1
LSU48	0	0	1	0	1
LSU49	0	0	1	0	1
LSU50	0	0	1	0	1
LSU51	0	1	0	0	1
LSU52	0	1	0	0	1
LSU53	0	1	0	0	1
LSU54	0	1	0	0	1
LSU55	0	1	0	0	1
LSU56	0	1	0	0	1
LSU57	0	1	0	0	1
LSU58	0	1	0	0	1
LSU59	0	1	0	0	1
LSU60	1	0	0	0	1
LSU61	1	0	0	0	1
LSU62	1	0	0	0	1
LSU63	1	0	0	0	1
LSU64	1	0	0	0	1
LSU65	1	0	0	0	1
LSU66	1	0	0	0	1
LSU67	1	0	0	0	1
LSU68	1	0	0	0	1

## APPENDIX B

# Protokoller

## B.1 CTAB miniprep DNA-ekstraksjon

Lag ekstraksjonsbuffer: 2 x CTAB + 1% 2-mercaptoetanol (10  $\mu$ L 2-mercaptoetanol/mL 2 x cTAB. Sett på varmeblokk (65 °C). Sett ekstraksjonsbufferen i vannbad på 65 °C.

1. Sentrifuger ned algematerialet i 30 mL Corex-rør ved 4000 rpm ved 4 °C i 30 minutter.
2. Dekanter og overfør pellet og noe væske til eppendorfrør. Sentrifuger ved 12 000 rpm i 5 minutter. Dekanter.
3. Tilsett 600  $\mu$ L ekstraksjonsbuffer. Varm til 65 °C.
4. Frys prøvene til  $-80$  °C (i ca 15 minutter). Varm til 65 °C i 15 minutter. Gjenta dette en gang.
5. La stå siste gang ved 65 °C i 1 time. Vortex hvert 15de minutt, og gnur med pistill etter 30 minutter.
6. Tilsett 500  $\mu$ L kloroform:isoamylalkohol (24:1). Ekstraher proteiner i 10 minutter på ristebord eller ved manuell risting og vortexing i 15 sekunder. Sentrifuger rørene i 5 minutter ved 12.000 rpm.
7. Ta av supernatanten til nye rør. NB! Ikke få med noe av grenselaget! Gjenta trinn 6 med supernatanten og ta av den nye supernatanten til nye rør.
8. Tilsett 10  $\mu$ g RNase per mL supernatant (0.5  $\mu$ L), inkuber i 30 minutter ved 37 °C og sett deretter rørene på is i 5 minutter for å stoppe RNase aktiviteten.
9. Fell DNA med iskald isopropanol; tilsett 2/3 (av supernatanten i step 8) volum isopropanol, bland godt ved å snu rørene ett par ganger, og la rørene stå i minst 30 minutter ved  $-20$  °C. Dette kan godt stå og felle over natten.
10. Sentrifuger i 10 minutter ved 12.000 rpm og hell deretter supernatanten forsiktig av.
11. Vask pelleten med 400  $\mu$ L 70% etanol (rist opp pellet). Sentrifuger i 2 minutter ved 12.000 rpm og hell av supernatanten.
12. Repeter trinn 11. Tørk deretter pelleten i ca. 2 timer i luft til all etanolen er borte. Prøvene kan eventuelt tørkes i 5–10 minutter på varmeblokk ved 65 °C.

13. Løs pelleten i 50 – 500  $\mu\text{L}$  TE buffer, avhengig av størrelse på pellet og ønsket konsentrasjon på DNA løsning. La pelleten gjerne stå og løse litt på benken og så over natten i kjøleskap før kvantifisering. Oppbevares deretter ved  $-20^{\circ}\text{C}$ .

CTAB-løsning: 4 g CTAB, 16.5 g NaCl, 2.4 g Tris-HCl, 1.2 g EDTA-Na<sub>2</sub>, Milli-Q vann til 200 mL. Juster pH til 8.0. Autoklaver.



# Kilder

- Acinas, S., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V. og Polz, M. (2005). PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and environmental microbiology*, 71(12):8966.
- Akima, H., Gebhardt, A., Petzoldt, T. og Maechler, M. (2006). akima: Interpolation of irregularly spaced data.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. og Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3):403–10.
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W. og Huse, S. M. (2009). A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PloS one*, 4(7):e6372.
- Andreae, M. og Raemdonck, H. (1983). Dimethyl sulfide in the surface ocean and the marine atmosphere: a global view. *Science*, 221(4612):744–747.
- Annett, A. L., Carson, D. S., Crosta, X., Clarke, A. og Ganeshram, R. S. (2009). Seasonal progression of diatom assemblages in surface waters of Ryder Bay, Antarctica. *Polar Biology*, 33(1):13–29.
- Arrigo, K., Worthen, D., Schnell, A. og Lizotte, M. P. (1998). Primary production in Southern Ocean waters. *Journal of Geophysical Research*, 103(C8):15587–15600.
- Arrigo, K. R. (1999). Phytoplankton Community Structure and the Drawdown of Nutrients and CO<sub>2</sub> in the Southern Ocean. *Science*, 283(5400):365–367.
- Barnard, W., Andreae, M. og Iverson, R. (1984). Dimethylsulfide and *Phaeocystis poucheti* in the southeastern Bering Sea. *Continental Shelf Research*, 3(2):103–113.
- Bathmann, U., Scharek, R., Klaas, C., Dubischar, C. og Smetacek, V. (1997). Spring development of phytoplankton biomass and composition in major water masses of the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 44(1-2):51–67.
- Boyd, P. (2002). The role of iron in the biogeochemistry of the Southern Ocean and equatorial Pacific: a comparison of in situ iron enrichments. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(9-10):1803–1821.
- Bracher, A., Kroon, B. og Lucas, M. (1999). Primary production, physiological state and composition of phytoplankton in the Atlantic Sector of the Southern Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 190:1–16.

- Caron, D. A., Countway, P. D., Savai, P., Gast, R. J., Schnetzer, A., Moorthi, S. D., Dennett, M. R., Moran, D. M. og Jones, A. C. (2009). Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology. *Applied and environmental microbiology*, 75(18):5797–808.
- Clarke, A. og Lidgard, S. (2000). Spatial patterns of diversity in the sea: bryozoan species richness in the North Atlantic. *Journal of Animal Ecology*, 69(5):799–814.
- Clarke, A., Meredith, M., Wallace, M., Brandon, M. og Thomas, D. (2008). Seasonal and interannual variability in temperature, chlorophyll and macronutrients in northern Marguerite Bay, Antarctica. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 55(18-19):1988–2006.
- Coale, K. H., Johnson, K. S., Chavez, F. P., Buesseler, K. O., Barber, R. T., Brzezinski, M. A., Cochlan, W. P., Millero, F. J., Falkowski, P. G., Bauer, J. E., Wanninkhof, R. H., Kudela, R. M., Altabet, M. A., Hales, B. E., Takahashi, T., Landry, M. R., Bidigare, R. R., Wang, X., Chase, Z., Strutton, P. G., Friederich, G. E., Gorbunov, M. Y., Lance, V. P., Hiltig, A. K., Hiscock, M. R., Demarest, M., Hiscock, W. T., Sullivan, K. F., Tanner, S. J., Gordon, R. M., Hunter, C. N., Elrod, V. A., Fitzwater, S. E., Jones, J. L., Tozzi, S., Koblizek, M., Roberts, A. E., Herndon, J., Brewster, J., Ladizinsky, N., Smith, G., Cooper, D., Timothy, D., Brown, S. L., Selph, K. E., Sheridan, C. C., Twining, B. S. og Johnson, Z. I. (2004). Southern Ocean iron enrichment experiment: carbon cycling in high- and low-Si waters. *Science*, 304(5669):408–14.
- Colwell, R. K. og Coddington, J. a. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 345(1311):101–18.
- Cuvelier, M. L., Allen, A. E., Monier, A., McCrow, J. P., Messié, M., Tringe, S. G., Woyke, T., Welsh, R. M., Ishoey, T., Lee, J.-H., Binder, B. J., Dupont, C. L., Latasa, M., Guigand, C., Buck, K. R., Hilton, J., Thiagarajan, M., Caler, E., Read, B., Lasken, R. S., Chavez, F. P. og Worden, A. Z. (2010). Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33).
- Dafner, E. og Mordasova, N. (1994). Influence of biotic factors on the hydrochemical structure of surface water in the Polar Frontal Zone of the Atlantic Antarctic. *Marine Chemistry*, 45(1-2):137–148.
- De Baar, H., de Jong, J., Bakker, D., Löscher, B., Veth, C., Bathmann, U. og Smetacek, V. (1995). Importance of iron for plankton blooms and carbon dioxide drawdown in the Southern Ocean. *Nature*, 373:412–415.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M. og Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue):W465–9.
- Detmer, A. og Bathmann, U. (1997). Distribution patterns of autotrophic pico- and nanoplankton and their relative contribution to algal biomass during spring in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 44(1-2):299–320.

- Dodge, J. og Priddle, J. (1987). Species composition and ecology of dinoflagellates from the Southern Ocean near South Georgia. *Journal of Plankton Research*, 9(4):685–697.
- Edwardsen, B., Eikrem, W., Green, J., Andersen, R., Moon-van Der Staay, S. og Medlin, L. (2000). Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia*, 39(1):19–35.
- Edwardsen, B. og Medlin, L. K. (2007). Molecular systematics of Haptophyta. In Brodie, J. og Lewis, J. [Eds.] *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics*. CRC Press, New York, side 183–196.
- Elwood, H. J., Olsen, G. J. og Sogin, M. L. (1985). The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Molecular biology and evolution*, 2(5):399–410.
- Esper, O. (2002). Distribution of organic-walled dinoflagellate cysts in surface sediments of the Southern Ocean (eastern Atlantic sector) between the Subtropical Front and the Weddell Gyre. *Marine Micropaleontology*, 46(1-2):177–208.
- Garrison, D. og Buck, K. (1989). The biota of Antarctic pack ice in the Weddell sea and Antarctic Peninsula regions. *Polar Biology*, 10(3):211–219.
- Gast, R. J., Moran, D. M., Beaudoin, D. J., Blythe, J. N., Dennett, M. R. og Caron, D. A. (2006). Abundance of a Novel Dinoflagellate Phylotype in the Ross Sea, Antarctica. *Journal of Phycology*, 42(1):233–242.
- Gieskes, W. og Elbrächter, M. (1986). Abundance of nanoplankton-size chlorophyll-containing particles caused by diatom disruption in surface waters of the Southern Ocean (Antarctic Peninsula region). *Netherlands Journal of Sea Research*, 20(2-3):291–303.
- Gille, S. T. (2002). Warming of the Southern Ocean since the 1950s. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5558):1275–7.
- Goericke, R. og Welschmeyer, N. (1993). The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 40(11-12):2283–2294.
- Gomi, Y., Taniguchi, A. og Fukuchi, M. (2007). Temporal and spatial variation of the phytoplankton assemblage in the eastern Indian sector of the Southern Ocean in summer 2001/2002. *Polar Biology*, 30(7):817–827.
- Gribaldo, S. (2002). Ancient Phylogenetic Relationships. *Theoretical Population Biology*, 61(4):391–408.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41:95–98.
- Harrison, S., Ross, S. J. og Lawton, J. H. (1992). Beta Diversity on Geographic Gradients in Britain. *The Journal of Animal Ecology*, 61(1):151.
- Heck Jr, K., van Belle, G. og Simberloff, D. (1975). Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology*, 56(6):1459–1461.



- Hillis, D. og Dixon, M. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66(4):411–453.
- Hugenholtz, P. (2003). Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1):289–293.
- Hughes, J., Hellmann, J., Ricketts, T. og Bohannan, B. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10):4399–4406.
- International Hydrographic Organization (1953). Limits of oceans and seas. *IHO Special Publication*, 23.
- Jacques, G. (1983). Some ecophysiological aspects of the Antarctic phytoplankton. *Polar Biology*, 1980(March):27–33.
- Jacques, G. og Panouse, M. (1991). Biomass and composition of size fractionated phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence area. *Polar Biology*, 11(5):315–328.
- Jardillier, L., Zubkov, M. V., Pearman, J. og Scanlan, D. J. (2010). Significant CO<sub>2</sub> fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *The ISME journal*, 4(9):1180–1192.
- Jones, H., Leadbeater, B. og Green, J. (1993). Mixotrophy in marine species of Chrysochromulina (Prymnesiophyceae): ingestion and digestion of a small green flagellate. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 73(02):283–296.
- Jordan, R. W. og Chamberlain, A. H. L. (1997). Biodiversity among haptophyte algae. *Biodiversity and Conservation*, 6(1):131–152.
- Koleff, P., Gaston, K. J. og Lennon, J. J. (2003). Measuring beta diversity for presence-absence data. *Journal of Animal Ecology*, 72(3):367–382.
- Kruskal, J. B. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29(1):1–27.
- Kumar, S., Skjaeveland, A., Orr, R. J. S., Enger, P. l., Ruden, T., Mevik, B. r.-H., Burki, F., Botnen, A. og Shalchian-Tabrizi, K. (2009). AIR: A batch-oriented web program package for construction of supermatrices ready for phylogenomic analyses. *BMC bioinformatics*, 10(357).
- Laubscher, R., Perissinotto, R. og McQuaid, C. (1993). Phytoplankton production and biomass at frontal zones in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Polar Biology*, 13(7):471– 481.
- Lennon, J. J., Koleff, P., Greenwood, J. J. D. og Gaston, K. J. (2001). The geographical structure of British bird distributions: diversity, spatial turnover and scale. *Journal of Animal Ecology*, 70(6):966–979.
- Levitus, S. (2005). Warming of the world ocean, 1955-2003. *Geophysical Research Letters*, 32(2):1–4.

- Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., Not, F. og de Vargas, C. (2009). Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31):12803–8.
- Malin, G., Turner, S. og Liss, P. (1992). Sulfur: the plankton/climate connection. *Journal of Phycology*, 28(5):590–597.
- Marchant, H. J. og Thomsen, H. A. (1994). Haptophytes in polar waters. In Green, J. C. og Leadbeater, B. S. C. [Eds.] *The Haptophyte Algae*. Clarendon Press, Oxford, side 209–228.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3):133–41.
- Martin, A. (2003). Phytoplankton patchiness: the role of lateral stirring and mixing. *Progress In Oceanography*, 57(2):125–174.
- Martin, J., Gordon, R. og Fitzwater, S. (1990). Iron in Antarctic waters. *Nature*, 345:156–158.
- Martin, J. H., Gordon, R. M. og Fitzwater, S. E. (1991). The case for iron. *Limnology And Oceanography*, 36(8):1793–1802.
- MathWorks (2010). MATLAB: The Language Of Technical Computing.
- Matrai, P. og Keller, M. (1993). Dimethylsulfide in a large-scale coccolithophore bloom in the Gulf of Maine. *Continental Shelf Research*, 13(8-9):831–843.
- McDonald, S. M., Sarno, D., Scanlan, D. og Zingone, A. (2007). Genetic diversity of eukaryotic ultraphytoplankton in the Gulf of Naples during an annual cycle. *Aquatic Microbial Ecology*, 50:75–89.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S. og Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2):491–9.
- Medlin, L. K., Lange, M. og Nöthig, E.-M. (2004). Genetic diversity in the marine phytoplankton: a review and a consideration of Antarctic phytoplankton. *Antarctic Science*, 12(03):325–333.
- Moon-van Der Staay, S., Staay, G. W. M. V. D., Guillou, L., Claustre, H., Medlin, L. K., Staay, S. Y. M.-v. D. og Vaultot, D. (2000). Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnology*, 45(1):98–109.
- Moon-van Der Staay, S. Y., De Wachter, R. og Vaultot, D. (2001). Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409(6820):607–10.
- Moore, J. og Abbott, M. (2000). Phytoplankton chlorophyll distributions and primary production in the Southern Ocean. *Journal of Geophysical Research*, 105(C12):28709.
- Moore, J. K., Abbott, M. R. og Richman, J. G. (1999). Location and dynamics of the Antarctic Polar Front from satellite sea surface temperature data. *PoLAR*, 104:3059 –3073.

- Morariu, V. I., Srinivasan, B. V., Raykar, V. C., Duraiswami, R. og Davis, L. S. (2008). Automatic online tuning for fast Gaussian summation. *Advances in Neural Information Processing Systems (NIPS)*.
- Nebel, M., Pfabel, C., Stock, A., Dunthorn, M. og Stoeck, T. (2010). Delimiting operational taxonomic units for assessing ciliate environmental diversity using small-subunit rRNA gene sequences. *Environmental Microbiology Reports*, side no-no.
- Nishida, S. (1986). Nannoplankton flora in the Southern Ocean, with special reference to siliceous varieties. *Memoirs of National Institute of Polar Research. Special issue*, 40:56–68.
- Nowlin, W. D. og Klinck, J. M. (1986). The physics of the Antarctic Circumpolar Current. *Reviews of Geophysics*, 24(3):469.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H. og Wagner, H. (2008). *vegan: Community Ecology Package*.
- Orsi, A., Whitworth, T. og Nowlin Jr, W. D. (1995). On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 42(5):641–673.
- Page, R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*, 12(4):357–8.
- Palmer, M. (1990). The estimation of species richness by extrapolation. *Ecology*, 71(3):1195–1198.
- Pawlowicz, R. (2009). *M\_Map: A mapping package for Matlab*.
- Porter, K. (1988). Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia*, 159(1):89–97.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J. og Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research*, 35(21):7188–96.
- Quince, C., Curtis, T. P. og Sloan, W. T. (2008). The rational exploration of microbial diversity. *The ISME journal*, 2(10):997–1006.
- R Development Core Team (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S. og Pace, N. R. (1992). Differential Amplification of rRNA Genes by Polymerase Chain Reaction. *Applied and environmental microbiology*, 58(10):3417–8.
- Rothberg, J. M. og Leamon, J. H. (2008). The development and impact of 454 sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10):1117–24.
- Rueter, J. G. og Ades, D. R. (1987). The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Journal of phycology*, 23(3):453–457.
- Sambrook, J. og Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 3. utgave.

- Scott, F. J., Marchant, H. J. og Australian Biological Resource Study (2005). *Antarctic Marine Protists*. Australian Biological Resources Study and Australian Antarctic Division, Canberra.
- Seaborn, D., Tengs, T., Cerbin, S., Kokocinski, M. og Marshall, H. (2006). A group of dinoflagellates similar to *Pfiesteria* as defined by morphology and genetic analysis. *Harmful Algae*, 5(1):1–8.
- Signorini, S. R., Garcia, V. M. T., Piola, A. R., Garcia, C. A. E., Mata, M. M. og McClain, C. R. (2006). Seasonal and interannual variability of calcite in the vicinity of the Patagonian shelf break (38S–52S). *Geophysical Research Letters*, 33(16):1–5.
- Sikes, E. og Volkman, J. (1993). Calibration of alkenone unsaturation ratios (Uk’37) for paleotemperature estimation in cold polar waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(8):1883–1889.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163:688.
- Smetacek, V., Klaas, C., Mendendeuer, S. og Rynearson, T. (2002). Mesoscale distribution of dominant diatom species relative to the hydrographical field along the Antarctic Polar Front. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(18):3835–3848.
- Sogin, M., Morrison, H., Huber, J., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M. og Herndl, J. H. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32):12115–12120.
- Spreen, G., Kaleschke, L. og Heygster, G. (2008). Sea ice remote sensing using AMSR-E 89-GHz channels. *Journal of Geophysical Research*, 113(C2):3481–3484.
- Stefels, J. (2000). Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research*, 43(3-4):183–197.
- Stewart, R. H. (1997). *Introduction to Physical Oceanography*. [http://oceanworld.tamu.edu/resources/ocng\\_textbook/contents.html](http://oceanworld.tamu.edu/resources/ocng_textbook/contents.html).
- Stoecker, D. K., Putt, M. og Moisan, T. (1995). Nano- and Microplankton Dynamics during the Spring Phaeocystis sp. Bloom in McMurdo Sound, Antarctica. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75(04):815.
- Suzuki, M. T. og Giovannoni, S. J. (1996). Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 62(2):625–30.
- Thomsen, H. A., Buck, K. R., Coale, S. L., Garrison, D. L. og Gowing, M. M. (1988). Nanoplanktonic coccolithophorids (Prymnesiophyceae, Haptophyceae) from the Weddell Sea, Antarctica. *Nordic Journal of Botany*, 8(4):419–436.
- Tillmann, U. (1998). Phagotrophy by a plastidic haptophyte, *Prymnesium patelliferum*. *Aquatic Microbial Ecology*, 14:155–160.
- Tilzer, M. (1987). Effects of temperature and day length on the mass balance of Antarctic phytoplankton. *Polar Biology*, side 35–42.

- Tilzer, M. M., Elbrächter, M., Gieskes, W. W. og Beese, B. (1986). Light-temperature interactions in the control of photosynthesis in Antarctic phytoplankton. *Polar Biology*, 5(2):105–111.
- Treguer, P. og Jacques, G. (1992). Dynamics of nutrients and phytoplankton, and fluxes of carbon, nitrogen and silicon in the Antarctic Ocean. *Polar Biology*, 12(2):149–162.
- Ugland, K. og Gray, J. (2004). Estimation of species richness: analysis of the methods developed by Chao and Karakassis. *Marine Ecology Progress Series*, 284(2003):1–8.
- de Vargas, C., Aubry, M.-P., Probert, I. og Young, J. (2007). Origin and Evolution of Coccolithophores : From Coastal Hunters to Oceanic Farmers. In Falowski, P. og Knoll, A. [Eds.] *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Elsevier Academic Press, London, side 251–286.
- Vaulot, D., Eikrem, W., Viprey, M. og Moreau, H. (2008). The diversity of small eukaryotic phytoplankton ( $< \text{or} = 3 \text{ microm}$ ) in marine ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 32(5):795–820.
- Verstrete, D. R., Storch, T. A. og Dunham, V. L. (1980). A comparison of the influence of iron on the growth and nitrate metabolism of *Anabaena* and *Scenedesmus*. *Physiologia*, 137(1):1459–51.
- Whittaker, R. (1960). Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30(3):279–338.
- Wolfe, G., Steinke, M. og Kirst, G. (1997). Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga. *Nature*, 387(6636):894–897.
- Wright, S., Thomas, D., Marchant, H., Higgins, H., Mackey, M. og Mackey, D. (1996). Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the 'CHEMTAX' matrix factorisation program. *Marine Ecology Progress Series*, 144:285–298.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Van Dolah, F. M., Nosenko, T., Lidie, K. L. og Bhattacharya, D. (2005). Tertiary endosymbiosis driven genome evolution in dinoflagellate algae. *Molecular biology and evolution*, 22(5):1299–308.
- Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D. og Vaulot, D. (2005). Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS microbiology ecology*, 52(1):79–92.